



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

# Identifizierung von Zelleintrittsinhibitoren der Ebolavirus-Infektion und die Optimierung eines Impfvektors

im Fachbereich für Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium

Dissertation von  
**Judith Atgé Martin**  
aus Berlin

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Barbara Schnierle

Darmstadt, 2021

Atgé Martin, Judith:

Identifizierung von Zelleintrittsinhibitoren der Ebolavirus-Infektion und die Optimierung eines Impfvektors

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2021

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-192605

Veröffentlicht unter CC BY 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses>

Datum der mündlichen Prüfung: 30.07.2021

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Barbara Schnierle in der Abteilung „*AIDS, neue und neuartige Erreger*“ am Paul-Ehrlich-Institut in Langen angefertigt.

Die Betreuung seitens der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, erfolgte durch Prof. Dr. Beatrix Süß.

*Für Emilia und Pierre*

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Ebolavirus.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Ausbrüche.....	1
1.1.2 Übertragung und Infektion .....	3
1.1.3 Genomischer Aufbau und virale Proteine .....	5
1.1.4 Virale Replikation .....	6
1.1.5 Das Ebolavirus-Glykoprotein und der Zelleintrittsprozess .....	9
<b>1.2 Ebolavirus-Therapien .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Zugelassene Ebolavirus-Zelleintrittshemmer.....	14
<b>1.3 Kleine Moleküle als Ebolavirus-Zelleintrittshemmer.....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Pseudotypisierte lentivirale Vektoren in Hochdurchsatzscreenings.....	18
1.3.2 Potentielle Ebolavirus-Zelleintrittshemmer .....	24
<b>1.4 Impfungen-Prävention viraler Infektionen .....</b>	<b>27</b>
1.4.1 Zugelassene Ebolavirus-Impfstoffe.....	29
<b>1.5 Impfvektoren .....</b>	<b>31</b>
1.5.1 Pockenvirus-basierte Impfvektoren.....	32
<b>1.6 SAMHD1- ein Protein mit antiviralem Wirkmechanismus .....</b>	<b>39</b>
<b>1.7 Vpx ermöglicht die virale Replikation in sich nicht teilenden Zellen.....</b>	<b>40</b>
<b>1.8 Zielsetzung .....</b>	<b>42</b>



<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>44</b>
2.1	<b>Zellen .....</b>	<b>44</b>
2.1.1	Säugerzelllinien und primäre Zellen .....	44
2.1.2	Medien und Zusätze für Zellkultur.....	45
2.2	<b>Viren .....</b>	<b>46</b>
2.3	<b>Plasmide .....</b>	<b>46</b>
2.4	<b>Antikörper.....</b>	<b>47</b>
2.4.1	Fluoreszenz-Antikörper.....	47
2.4.2	Primärantikörper.....	48
2.4.3	Sekundärantikörper .....	48
2.5	<b>Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>49</b>
2.6	<b>Kits.....</b>	<b>51</b>
2.7	<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>52</b>
2.8	<b>Geräte .....</b>	<b>53</b>
2.9	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>55</b>
2.10	<b>Software.....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>57</b>
3.1	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>57</b>
3.1.1	Isolation von zellulärer DNA .....	57
3.1.2	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	57
3.1.3	Quantitative PCR (qPCR) .....	57
3.2	<b>Zellkultur-Techniken .....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	58
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl .....	58
3.2.3	Lagerung von Zellen .....	59
3.2.4	Herstellung von Zelllysaten .....	59

3.2.5	Ebolavirus-Neutralisationsassay im 384-Well Format .....	60
3.2.6	NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reportergen-Assay .....	60
3.2.7	Generierung von humanen dendritischen Zellen .....	61
<b>3.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Bestimmung der Proteinmenge .....	65
3.3.2	Natrium Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	65
3.3.3	Immunoblotanalysen .....	66
3.3.4	Immunfärbung .....	67
3.3.5	Strippen der Membran .....	68
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung von Inhibitoren des Ebolavirus-Zelleintritts .....</b>	<b>69</b>
4.1.1	Herstellung einer humanen Peptidbibliothek aus Hämofiltrat .....	70
4.1.2	Identifizierung von Inhibitoren des Ebolavirus-Zelleintritts innerhalb einer Hämofiltrat-Peptidbibliothek .....	71
4.1.3	Zelltoxizitätsassay mit potentiell Ebolavirus-Zelleintritt hemmenden Peptidfraktionen .....	76
4.1.4	Peptidfraktionen hemmen Luziferaseaktivität .....	77
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung eines optimierten Pockenvirus-Impfvektors .....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Vorarbeiten .....	81
4.2.2	Expression von SAMHD1 und Vpx in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen .....	86
4.2.3	DNA-Replikation in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen .....	88
4.2.4	Späte Genexpression in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen .....	90
4.2.5	Reifung humaner dendritischer Zellen durch MVA-Vpx-Infektion .....	92
4.2.6	<i>In vitro</i> T-Zell-Proliferation nach MVA-Vpx Infektion .....	105
4.2.7	Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern nach MVA-Vpx Infektion .....	111
4.2.8	Typ I Interferon-Sekretion nach MVA-Vpx-Infektion .....	117
4.2.9	Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors nach MVA-Vpx-Infektion .....	120
4.2.10	Auslösen der Apoptose nach MVA-Vpx-Infektion .....	122

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>124</b>
5.1	Identifizierung von Inhibitoren des Ebolavirus-Zelleintritts innerhalb einer Hämofiltrat-Peptidbibliothek.....	124
5.2	Optimierung des Pockenvirus-basierten Impfvektors MVA .....	128
5.2.1	DNA-Replikation und späte Genexpression nach MVA-Vpx Infektion .....	128
5.2.2	Reifung humaner dendritischer Zellen nach MVA-Vpx Infektion .....	130
5.2.3	MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen aktivieren T-Zellen <i>in vitro</i> nicht .....	134
5.2.4	Inhibierung der Typ I-Interferonsekretion durch MVA-Vpx.....	136
5.2.5	Inhibierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach MVA-Vpx-Infektion .....	138
5.2.6	Apoptose wird durch die MVA-Vpx-Infektion ausgelöst.....	139
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>162</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>164</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>166</b>
<b>11</b>	<b>KONFERENZEN.....</b>	<b>167</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>168</b>
<b>13</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>169</b>
<b>14</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>170</b>

# ZUSAMMENFASSUNG

---

Eine Infektion mit dem Ebolavirus ist eine der tödlichsten Viruserkrankungen für den Menschen. Während des großen Ebolavirus-Ausbruchs der Jahre 2014 bis 2016 in Westafrika starben schätzungsweise 11 000 von 23 000 Infizierten. Bis heute kommt es immer wieder zu Ebolavirus-Ausbrüchen in der Demokratischen Republik Kongo. Hohe Ansteckungsraten und fehlende Therapiemöglichkeiten führten zu Mortalitätsraten bis zu 50% im Durchschnitt (WHO, 2020). Zunehmende Globalisierung und Mobilität der Menschen haben außerdem zur Folge, dass Ausbrüche des Ebolavirus nicht länger lokal begrenzt bleiben, sondern auch eine Verbreitung über mehrere Kontinente ermöglichen.

Forscher fokussieren im Kampf gegen virale Krankheiten auf antivirale Therapeutika und Impfstoffe. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf diese beiden Ansätze gelegt. Während zwei Ebolavirus-Impfstoffe seit 2020 zugelassen sind, konnten noch keine Therapeutika basierend auf kleinen Molekülen/Peptiden identifiziert werden, die eine Bindung des Ebolavirus an Zellen unterdrücken. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Hämofiltrat-Peptidbibliothek mithilfe von lentiviralen pseudotypisierten Ebolavirus-Vektorpartikeln mit einem Luziferase-Reportergen auf Zelleintrittshemmer durchsucht. Innerhalb der 384 verschiedenen Peptidfraktionen konnten 5 verschiedene Peptidfraktionen als potentielle Ebolavirus-Zelleintrittshemmer identifiziert werden. Allerdings stellten sich diese Peptidfraktionen nach genaueren Analysen als Luziferase-hemmende Peptide heraus.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Optimierung des Impfvektors Modifiziertes Vakziniavirus Ankara (*Modified Vaccinia Ankara*-MVA). MVA ist ein etablierter und sicherer Impfvektor, dessen Wirksamkeit gegen zahlreiche Viren seit langem genutzt wurde. In humanen dendritischen Zellen synthetisiert MVA aber keine späten Genprodukte. Dies könnte an dem antiviralen Protein SAM Domäne und HD-Domäne beinhaltendes Protein 1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1-SAMHDI*) liegen. SAMHDI reduziert den Pool an Deoxyribonukleotid-Triphosphaten im Zytoplasma von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presentating cells*-APC) und damit die Neusynthese der viralen DNA. Die DNA-Replikation wird aber zur Expression von späten MVA-Genen bzw. den heterologen Antigenen benötigt, die unter starken späten MVA-Promotoren exprimiert werden. Ist die DNA-Replikation in APCs wiederhergestellt, kann die Expression später MVA-Gene bzw. der Antigene unter späten starken Promotoren stattfinden und diese

somit direkt über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major compatibility complex*-MHC) den T-Zellen präsentiert werden. Diese Wiederherstellung der DNA-Replikation kann durch den Abbau von SAMHD1 erfolgen. Virale Proteine wie das von HIV-2 und SIV exprimierte virale Protein x (*virale Protein x*-Vpx) sind bekannt dafür, SAMHD1 dem proteosomalen Abbau zuzuführen. Aus diesem Grund wurde in Vorarbeiten das SIV *vpx* Gen in das MVA-Genom eingeführt und folglich MVA-Vpx genannt.

Für die Untersuchung der Vpx-Funktion wurden humane dendritische Zellen mit MVA-Vpx infiziert. Es konnte gezeigt werden, dass mit MVA-Vpx die DNA-Replikation, aber auch die späte Genexpression in humanen dendritischen Zellen wiederhergestellt werden kann. Da die späte Genexpression zu einer verbesserten Vektorimmunogenität führen kann, erfolgten in dieser Arbeit vergleichende immunologische Untersuchungen. Diese beinhalteten die Reifung von MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen, welche anhand der CD80 (Cluster of Differentiation-CD), CD86-, MHC I- und MHC II-Expression, sowie der Sekretion der Zytokine Interleukin (IL)-6 und Tumor-Nekrose Faktor-(TNF) $\alpha$  untersucht wurde. Weitere vergleichende immunologische Untersuchungen erfolgten im Bezug auf die Interferonantwort. Zusätzlich wurde auch das Auslösen der Apoptose durch MVA-Vpx infizierte humane dendritische Zellen untersucht. Es deuteten sich Unterschiede in der Reifung von MVA-Vpx-infizierten und MVA-infizierten dendritischen Zellen an. Während es scheinbar Unterschiede bei der CD80 - und CD86-Expression zwischen MVA und MVA-Vpx infizierten humanen dendritischen Zellen gibt, scheint die MHC I -und MHC II-Expression ähnlich hoch zu sein. In der IL-6 und TNF $\alpha$ -Sekretion von MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen gab es keinen Unterschied zu jener von MVA-infizierten humanen dendritischen Zellen. Die Apoptose wurde in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen ähnlich schnell ausgelöst wie durch MVA-infizierte humane dendritische Zellen. Allerdings zeigten die Untersuchungen zur Interferonantwort Unterschiede. Die Interferon  $\alpha$  - und  $\beta$  -Sekretion nach MVA-Vpx-Infektion von humanen dendritischen Zellen war deutlich reduziert zu jener Sekretion durch eine MVA-Infektion.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit innerhalb der Peptidbibliothek aus humanen Hämofiltrats kein Ebolavirus-Zelleintrittshemmer identifiziert werden konnte. Dennoch konnte die vorliegende Arbeit Einblicke in die Funktion des Impfvektors MVA-Vpx geben.

# SUMMARY

---

Ebola virus disease (EVD) is one of the deadliest infectious disease in the world. The large 2014 - 2016 EVD outbreak resulted in over 23 000 infections including at least 11 000 deaths. To this day there are still ongoing EVD outbreaks, mostly confined to the Democratic Republic of Congo. The high infection rate and lack of treatment led to a mortality rate of up to 50% during the big 2014 - 2016 outbreak (WHO, 2020). Additionally, globalisation and mobility of people could spread the virus to other continents such as Europe or America.

To fight viral diseases researchers focus on developing antiviral therapeutics and vaccination, therefore both approaches were covered in this thesis. Since 2020 two different vaccines have been used against the Ebola virus. However, there is no therapeutic method with small molecules yet available to inhibit cell entry of the virus. A peptide library originated from human hemofiltrates was therefore screened with pseudotyped Ebola virus lentiviral particles for neutralizing activities. However, no Ebola virus cell entry inhibitor could be detected in the 384 peptide fractions tested. Positive hits were only inhibitors of luciferase enzymatic activity, which was used as a readout.

The second approach of this thesis was the optimisation of the viral vector Modified Vaccinia Ankara (MVA), which is already under development as recombinant vector vaccine against different virus infections but MVA does not produce late viral proteins in human dendritic cells. This could be linked to the antiviral Protein SAM domain and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1). SAMHD1 is a cellular enzyme which reduces the dNTP pool in antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells, thereby restricting the synthesis of new viral DNA. Given the cascade-like replication cycle of MVA, DNA replication is needed to express late MVA genes or rather the heterologous antigens expressed under strong late MVA promoters. If DNA replication in dendritic cells is blocked, heterologous genes under strong late MVA promoters are not expressed and consequently the corresponding antigens cannot be presented through the MHC class proteins to T-cells. However, degradation of SAMHD1 could result in a recovery of DNA replication. The viral protein Vpx of HIV2 and SIV is one of the proteins known to promote the degradation of SAMHD1. For this reason, in initial work the SIV *vpx* gene was introduced into the MVA genome and the resulting virus was named MVA-Vpx.

## SUMMARY

---

To investigate the function of Vpx in the MVA genome, human dendritic cells were infected with MVA-Vpx. MVA-Vpx infection resulted in SAMHD1 protein degradation and enabled MVA-Vpx to replicate its DNA genome and to express genes controlled by late promoters. As late gene expression might enhance vector immunity, maturation markers of human dendritic cells were first analysed. While CD80 and CD86 expression seems to be lower in MVA-Vpx-infected human dendritic cells than in MVA-infected human dendritic cells, the expression of MHC I and MHC II seems to be similar. No difference in the secretion of IL6 and TNF $\alpha$  between MVA- and MVA-Vpx-infected human dendritic cells could be detected.

Also, no difference was determined in the triggering of apoptosis after MVA-Vpx infection compared to MVA infection. Surprisingly, the type I interferon secretion induced by MVA infection was blocked by *vpx* expression.

In this thesis no Ebola virus specific entry inhibitor could be identified but it still gives insights into the function of the new vector vaccine MVA-Vpx.

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 Das Ebolavirus

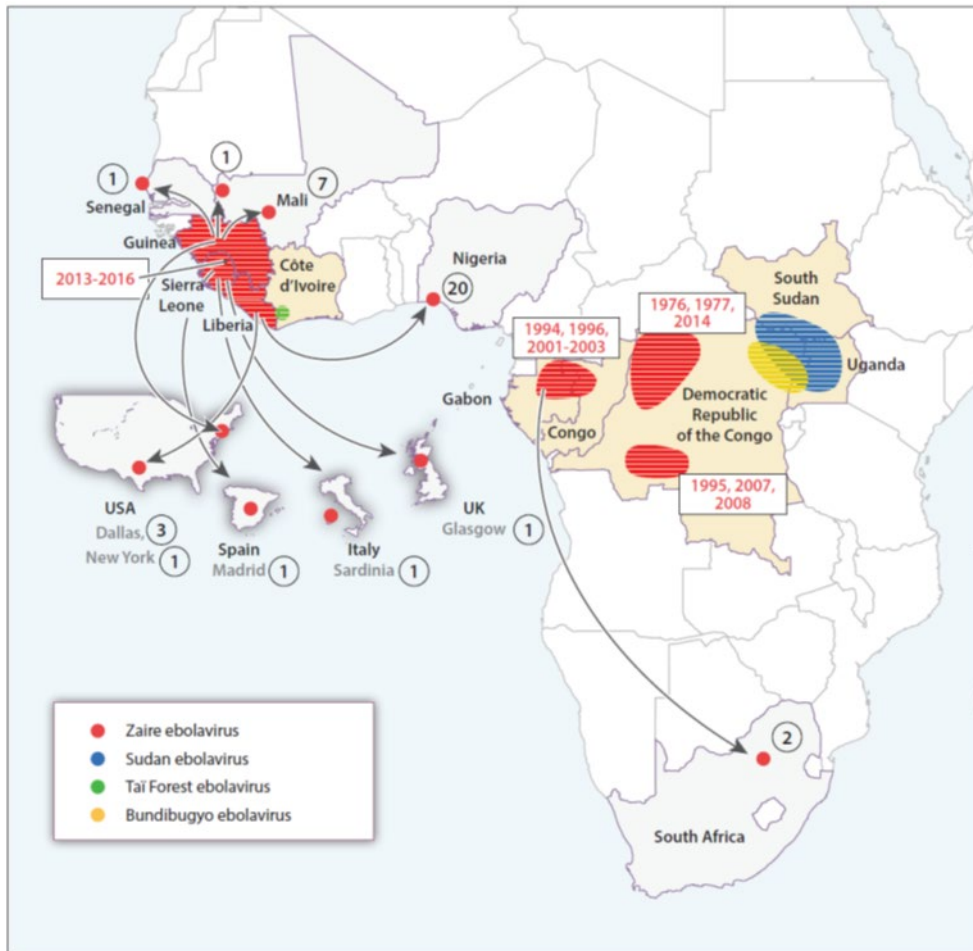
### 1.1.1 Ausbrüche

Das Ebolavirus gehört zur Familie der *Filoviridea*. Die Gattung Ebolavirus wird in 5 verschiedene Spezies unterteilt: das *Tai Forest*-Ebolavirus, das *Reston*-Ebolavirus, das *Sudan*-Ebolavirus, das *Bundibugyo*-Ebolavirus und das *Zaire*-Ebolavirus (Kuhn et al. 2010). Das Ebolavirus ist eines der virulentesten Pathogene für den Menschen. Innerhalb weniger Tage induziert es hämorrhagisches Fieber und führt in vielen Fällen anschließend zum Tod (Leroy et al. 2011).

Seit das Ebolavirus 1976 in der Nähe des Flusses in Zaire (heute Demokratische Republik des Kongo) und Sudan (Heute Republik des Sudans) das erste Mal entdeckt wurde, kam es immer wieder zu kleineren Ausbrüchen, die auf dem afrikanischen Kontinent beschränkt blieben. Daher wurde dem Ebolavirus bis 2014 wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Allerdings kam es 2014 - 2016 zu einer der größten Epidemien verursacht durch das Ebolavirus in der Geschichte bei dem sich 28 616 Menschen infizierten und 11 310 davon an der heimtückischen Ebolavirus-Krankheit starben und bei dem sich der Ausbruch auch auf andere Kontinente ausbreitete (WHO, 2020).

Seit 2016 kam es noch zu vier weiteren Ebolavirus-Ausbrüchen, welche in der Demokratischen Republik des Kongo deklariert wurden, aber dort beschränkt blieben. Seit 14. Februar 2021 wurde in Guinea das erste Mal seit dem großen Ausbruch von 2014 - 2016 ein erneuter Ebolavirus-Ausbruch bestätigt (WHO, 2021).





**Abbildung 1: Geographische Verteilung der Ebolavirus Ausbrüche von 1976-2016 weltweit**

Die Karte zeigt die bis 2016 vorgekommenen Ebolavirus-Ausbrüche der 4 verschiedenen Ebolavirus-Stränge Zaire, Sudan, Tai Forest, Bundibugyo (Baseler et al. 2017).

### 1.1.2 Übertragung und Infektion

Das tierische Reservoir der Ebolaviren, welches das Virus auf den Menschen überträgt, ist bis heute nicht bekannt. Es wird angenommen, dass es von Fledermäusen, Eichhörnchen, Mäusen, Ratten, der Haselmaus und der Spitzmaus übertragen werden kann (Peterson et al. 2004). Andere Forscher gehen davon aus, dass Hammerköpfige (*Hypsignathus monstrosus*) und Halskraus (*Myonycteris torquata*)-Flughunde, welche zur Familie der Pteropodidae gehören, die eigentlichen Überträger des Ebolavirus sind (Gatherer 2014).

Der Weg der Übertragung des Virus vom unbekannten Reservoir zum End-Wirt Mensch ist bis heute nicht geklärt. Die Übertragung von Mensch zu Mensch verläuft durch direkten Körperkontakt, wenn z.B. Schleimhäute oder verletzte Hautstellen mit infektiösen Körperflüssigkeiten wie Urin, Kot oder Erbrochenem in Kontakt kommen. Aber auch durch mit infektiösem Material kontaminierte Spritzen kann das Ebolavirus in die Blutlaufbahn gelangen. Zusätzlich sorgen die traditionellen afrikanischen Beerdigungstraditionen, bei denen der Leichnam von der Trauergemeinde berührt wird, für eine schnelle Übertragung des Virus.

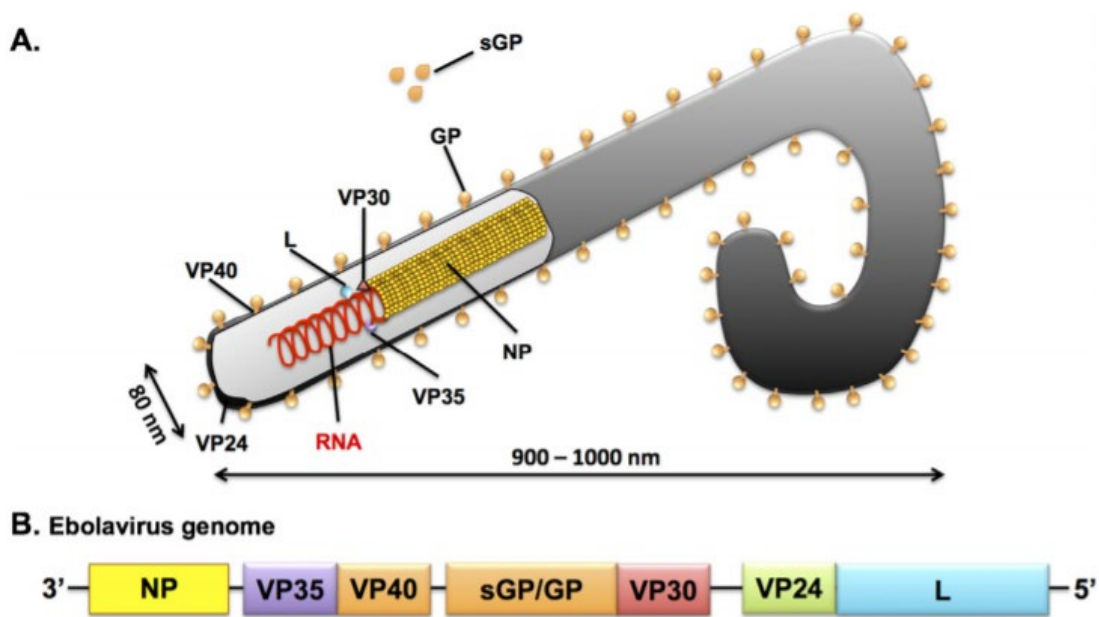
Eine Infektion mit dem Ebolavirus ist hochpathogen und endet innerhalb von 10 Tagen oft tödlich. Nach einer Inkubationszeit von 2-21 Tagen (im Durchschnitt sind es 4-9 Tage) kommt es zu den Anfangssymptomen wie Kopfschmerzen, leichtes Fieber, Muskelschmerzen und Übelkeit. Schnell kommt es zu Magen-Darm-Problemen mit Erbrechen und Durchfall, Atemwegsproblemen, welche sich in Husten, Brustschmerzen und Kurzatmigkeit manifestieren. Auch neurologische Probleme wie Prostration, Bewusstseinsstörungen oder Krampfanfälle gehören zu den Symptomen. Es kommt zu Sehstörungen, Blutgerinnungsstörungen und der Elektrolythaushalt ist gestört. Die tödliche Phase mit inneren Blutungen, welche sich vor allem durch Nasenbluten, Ausschlag, Malaena und Hämatemesis manifestiert, tritt sehr rasch ein. Infizierte Personen sterben durch Tachypnoe (überhöhte Atemfrequenz), Krämpfe, metabolische Störungen, Multi-Organversagen, Blutgerinnungsstörungen und Schock. Überlebende einer Ebolavirus-Infektion zeigen nach 7-11 Tagen eine Ebolavirus-spezifische IgG-Antikörper-Antwort und Ebolavirus-spezifische T-Gedächtniszellantworten (cdc.com). Die Ebolaspezifische Immunantwort ist vor allem gegen das Nukleoprotein, das Glykoprotein und VP40 gerichtet und kann mit allen Ebolavirus-Spezies kross-reagieren (Natesan et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass auch nach 40 Jahren eine Ebolavirusspezifische-Immunität bei Ebolavirus-Überlebenden vorliegt (Rimoin et al. 2018). Ein großes Problem stellen die Langzeitfolgen einer Ebolavirus-Infektion dar.

Überlebende klagen mindestens 2 Jahre nach der Ebolavirus-Infektion über Kopfschmerzen, Müdigkeit, Muskel und Gelenkschmerzen. Diese Schmerzen können auf erhöhte Entzündungsmarker innerhalb des Blutes, aber auch der Gewebszerstörung durch das Virus sowie dauerhafte T-Zell und B-Zellaktivierung und der Mangel an dendritischen Zellen zurückzuführen sein (Wiedemann et al. 2020). Zusätzlich wurde in Überlebenden das Ebolavirus noch im Sperma, in den Augen und bei Schwangeren in der Plazenta oder im Fötus bis zu 9 Monate nach der Ebolavirus-Infektion entdeckt (WHO, 2020).

### 1.1.3 Genomischer Aufbau und virale Proteine

Das Ebolavirus ist ein behülltes Virus mit einem nicht-segmentierten, negativ-strängigen Ribonukleinsäure (RNS)-Genom. Das Genom hat eine Größe von 19 kb mit 7 verschiedenen Genen, welche für das Nukleoprotein (NP), 3 Glykoproteine (GP<sub>1,2</sub>, sGP, ssGP), 4 virale Proteine (VP24, VP30, VP35, VP40) und die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase kodieren (Abbildung 2). Sie werden von nicht-translatierten *Trailer*- und *Leader*-Regionen flankiert, welche das *cis*-agierende Signal aufweisen. Das *cis*-agierende Signal ist für die Einhüllung, der viralen Transkription und der Replikation zuständig. Die Gene für die viralen Proteine enthalten mehrere offene Leserahmen. Sie werden von ungewöhnlich langen, nicht-translatierten Sequenzen, welche eine Größe von 57 bis 648 Nukleotiden haben, flankiert. Am Anfang und Ende des Genoms befinden sich hochkonservierte Signale zum Start bzw. Stopp der Transkription. Durch kurze intergenische Regionen (4-9 nicht-konservierte Nukleotide) oder durch Überlappungen sind die einzelnen Gene voneinander getrennt.

Zu den 3 Glykoproteinen gehören das G<sub>1,2</sub>, welches zum einen ein membrangebundenes Oberflächenprotein ist (G<sub>1</sub>) und für die Fusion des Virus mit der Zellmembran zuständig ist (G<sub>2</sub>), sowie das lösliche (*soluble*) Glykoprotein (sGP), welches nicht in die viralen Partikel verpackt, sondern von der infizierten Zelle sekretiert wird und das lösliche kleine (*small soluble*) Glykoprotein (ssGP). Eine Funktion des sGP ist die Stabilisierung der Barrierefunktion von Endothelzellen (Wahl-Jensen et al. 2005). Zusätzlich wird dem sGP die Funktion der Reduktion der viralen Zytotoxizität zugeschrieben, indem es die Menge an sekretiertem G<sub>1,2</sub> herabsetzt. Das sekretierte sGP soll auch dafür sorgen, dass Antikörper vermehrt an sGP binden und nicht an GP<sub>1,2</sub> binden können (Martin et al. 2016). Die Funktion des ssGP mit einer Größe von 36 kDa ist bis heute nicht bekannt. Es wird als Dimer sekretiert, welches eine sehr starke N-glykosilierte Disulfidbrücke zwischen den Cys53 beider Monomere aufweist (Mehedi et al. 2011; Picazo und Giordanetto 2015).



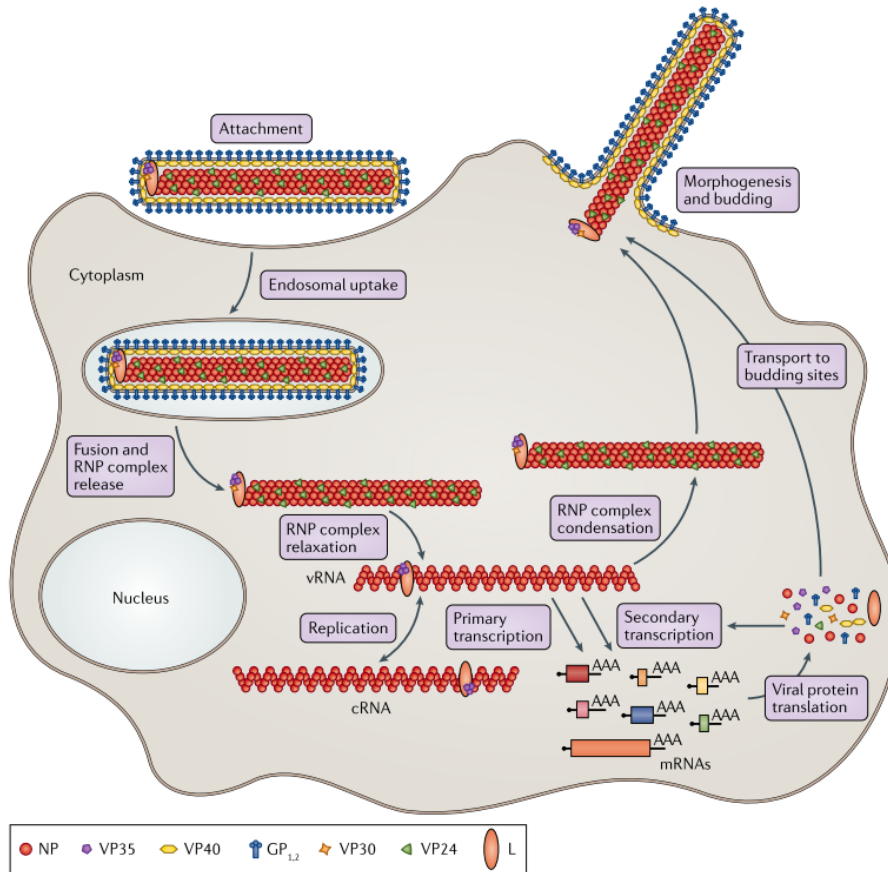
**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Filovirus-Partikels (A) und Ebolavirus-Genoms (B)**

- A: Fadenförmiges Filovirus mit negativ-strängigem RNA-Genom und 7 strukturellen Proteinen  
 B: Proteine, kodiert im Ebolavirus-Genom: Nukleoprotein (NP), Polymerase-Kofaktor (VP35), Matrixprotein (VP40), Glykoprotein (GP), Replikations-Transkriptionsprotein (VP30), kleines Matrixprotein (VP24) und RNA-abhängige RNA-Polymerase (L). (Rougeron et al. 2015)

### 1.1.4 Virale Replikation

Das Ebolavirus bindet mithilfe seines Glykoproteins an zelluläre Rezeptoren auf dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten sowie Endothelzellen der Leber und Lymphknoten. Potenzielle zelluläre Rezeptoren, an die das Ebolavirus bindet, sind unter anderen C-Lektine, Folsäure-Rezeptor- $\alpha$ , RhoGTPase,  $\beta$ -Integrine, Glykosaminoglykane und TIM/TAM-Rezeptoren. Sobald das Virus mit dem Glykoprotein an die Zelle gebunden hat, gelangt es über einen Makropinozytose-ähnlichen Prozess in das Zellinnere. Das Virus wird durch frühe und späte Endosomen in der Zelle transportiert. Innerhalb des sauren Milieus des Endosoms wird das Glykoprotein proteolytisch gespalten. Die Spaltung sorgt für die Interaktion des Glykoproteins mit dem zellulären Rezeptor Niemann-Pick C1 (NPC1), ein Cholesterin-Transporter, wodurch es zur Fusion mit der endosomalen Membran kommt und somit zur Freigabe des viralen Nukleokapsids in das Zytoplasma. Im Zytoplasma findet die Genom-Replikation und anschließend die erste Transkription statt. Bei der Replikation kommt es zunächst zur Synthese eines positiv-strängigen Replikationsintermediats, welches Antigenom genannt wird. Das Antigenom dient anschließend als Vorlage für die Generierung von neuen

Genomen. Sowohl Genom als auch Antigenom werden durch die Nukleokapsid-Proteine eingehüllt. Während der Transkription wird das negativ-strängige RNA-Genom in 7 monocistronische messenger Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*-mRNA)-Spezies transkribiert. Diese mRNAs werden „gecapped“ und polyadenyliert. Es wird angenommen, dass die RNA-Polymerase durch eine einzige Polymerase-Bindestelle am 3'-Ende Zugang zu den viralen Genen hat. Sobald der Polymerase-Komplex gebunden hat, kann er entlang der RNA fortschreiten. Durch Stoppen und Wiederaufnahme an jeder Genverbindung können die individuellen Gene in ihrer 3'-5' Richtung transkribiert werden. Das erste Gen, welches transkribiert wird, ist das Nukleoprotein (NP), während die Polymerase das letzte Gen ist (Mühlberger 2007). Nach der ersten Replikation und Transkription kommt es zu einer zweiten Transkription in sogenannten *inclusion bodies*. Die daraus resultierende RNA wird daraufhin von den viralen Proteinen NP, VP35 und VP24 eingehüllt, um das Nukleokapsid zu formen. Es wird angenommen, dass das Nukleoprotein helikale Tubes formt. VP35 und VP24 interagieren mit diesen von NP geformten Helices, was zur Entstehung von Nukleokapsid-ähnlichen Strukturen führt. Der Transport des Nukleokapsids zur Plasmamembran und der Einbau des Komplexes in Virionen werden durch das Zusammenspiel von NP und VP40 gewährleistet (White und Schornberg 2012) (Abbildung 3).

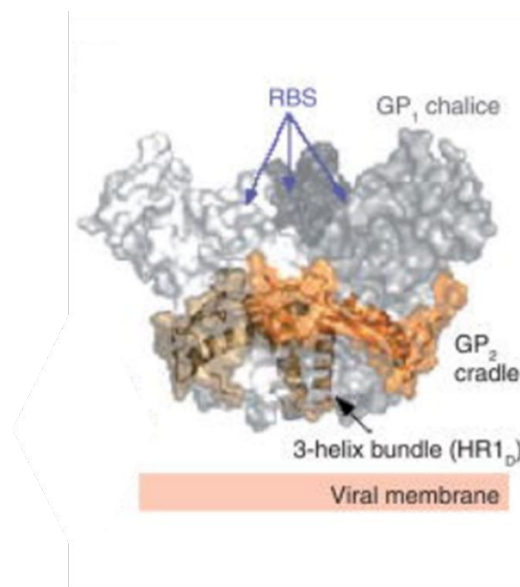


**Abbildung 3: Ebolavirus-Lebenszyklus**

Das Ebolavirus bindet an der Zelloberfläche und wird durch Makropinozytose in Endolysosomen in die Wirtszelle aufgenommen. Das Ebolavirus fusioniert mit der endolysosomalen Membran und der Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) (bestehend aus Nucleoprotein, der Polymerase, VP35 und VP30) wird ins Zytoplasma entlassen. Dort erfolgt die Transkription, welche durch RNP-Proteine vereinfacht wird. Die Translation von viraler mRNA wird durch Wirtszellribosomen durchgeführt. Die neu synthetisierten Proteine ermöglichen die sekundäre Transkription und Genomreplikation. Dabei wird die virale genomische RNA über ein antigenomisches Intermediat kopiert. Neu geformte RNP-Komplexe kondensieren in eine Form, die verpackungskompatibel ist. Sie werden zu den Zellknospungsstellen transportiert. Dort finden die Assemblierung und die Knospung eingeleitet durch VP40 statt. Die neu entstandenen Virionen werden aus der Zelle entlassen (Hoenen et al. 2019).

### 1.1.5 Das Ebolavirus-Glykoprotein und der Zelleintrittsprozess

Das trimere Glykoprotein ist für alle Schritte des Zelleintrittsprozesses zuständig. So sorgt es mit der Bindung des Viruspartikels an die zellulären Rezeptoren für den Zelleintritt und für die Fusion des viralen Partikels mit der Wirtsmembran. Das Glykoprotein gehört zur Klasse I der viralen Fusionsproteine. Es wird proteolytisch gespalten, um mit der Zellmembran fusionieren zu können. Der Glykoprotein-Vorläufer ist ein langes Polypeptid und wird am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Anschließend wird es über den klassischen Sekretionsweg am Golgi-Apparat weiterverarbeitet. Am ER werden Signalpeptide entfernt, es erfolgt die N-Glykosylierung und die Oligomerisierung, während am Golgi die Acetylierung, Phosphorylierung und die Spaltung durch Furin in die große extrazelluläre rezeptorbindende Untereinheit GP1 und die Fusions-Untereinheit GP2 erfolgt (Dolnik et al. 2008). GP1 und GP2 werden durch eine Disulfidbrücke und nicht-kovalenten Interaktionen zusammengehalten. GP1 und GP2 formen zusammen eine trimere Kelch-Struktur, welche aus drei GP1- und drei GP2-Untereinheiten besteht, wobei die GP2-Untereinheiten den Komplex in der Membran verankern (Abbildung 4). GP2 ist aber auch für den Viruseintritt und die Fusion der viralen mit der Wirtszellmembran zuständig. Im Trimer sind GP1 und GP2 über eine Disulfidbrücke zwischen Cystein (Cys) 53 von GP1 und Cys609 von GP2 miteinander verbunden (Martin et al. 2016).

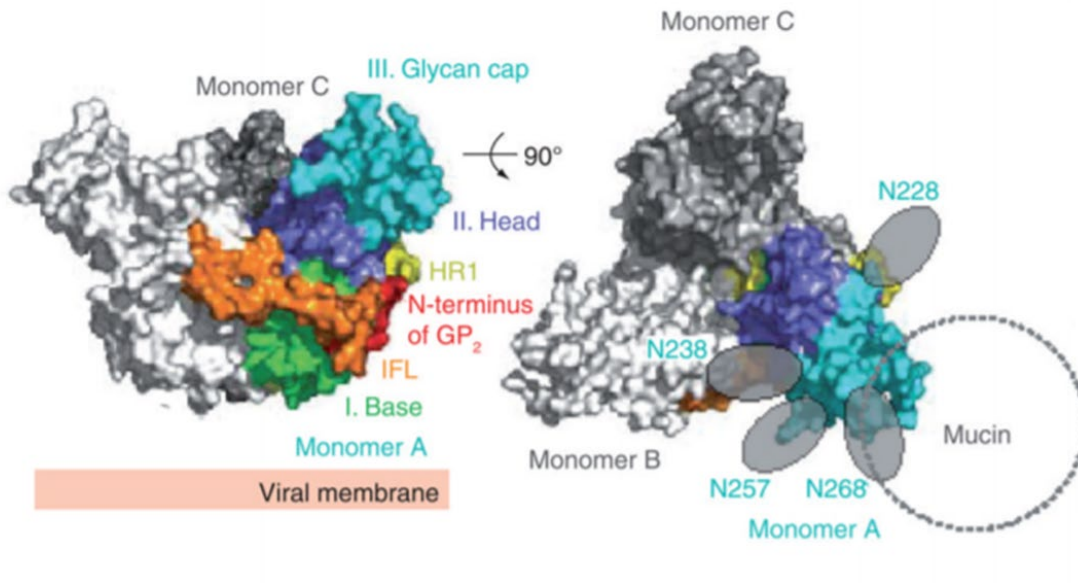


**Abbildung 4: Molekulare Oberfläche des Zaire-Ebolavirus-Glykoproteins**

Die drei GP1 Untereinheiten (grau) formen die trimere kelchartige Struktur, um die die drei GP2 Untereinheiten (orange) herumgewickelt sind. RBS= Rezeptorbindestelle (*receptor binding site*) (geändert nach (Lee und Saphire 2009a).

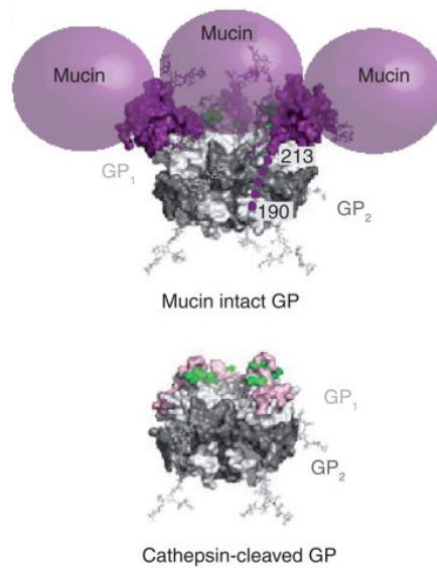






**Abbildung 6: Molekulare Oberfläche des Glykoprotein Trimers mit den verschiedenen Domänen**  
 Links: Glykoprotein-Trimer von der Seite, rechts: entlang seiner dreifachen Achse.  
 GP1-Glykan-Cap: Cyan, GP-Kopf: lila, GP1-Basis: grün, GP2-N-Terminus: rot, GP2-Interner Loop (IFL): orange, GP2-Heptad repeat region (HR1): gelb (geändert nach (Lee und Saphire 2009a)).

GP1 besitzt eine Muzin-ähnliche Domäne, die stark glykosyliert ist (Abbildung 6, Abbildung 7). Die Muzin-ähnliche Domäne soll für die Zytotoxizität und das Abrunden der Zellen verantwortlich sein. Nach der Aufnahme des Virus in die sauren Endosomen wird das Glykoprotein durch Cathepsin L (CatL) und Cathepsin B (CatB) (nur bei saurem pH aktiv) gespalten (Hood et al. 2010). CatB und CatL entfernen die Muzin-ähnliche Domäne und die Glykan-Kappe von GP1 (Abbildung 7).

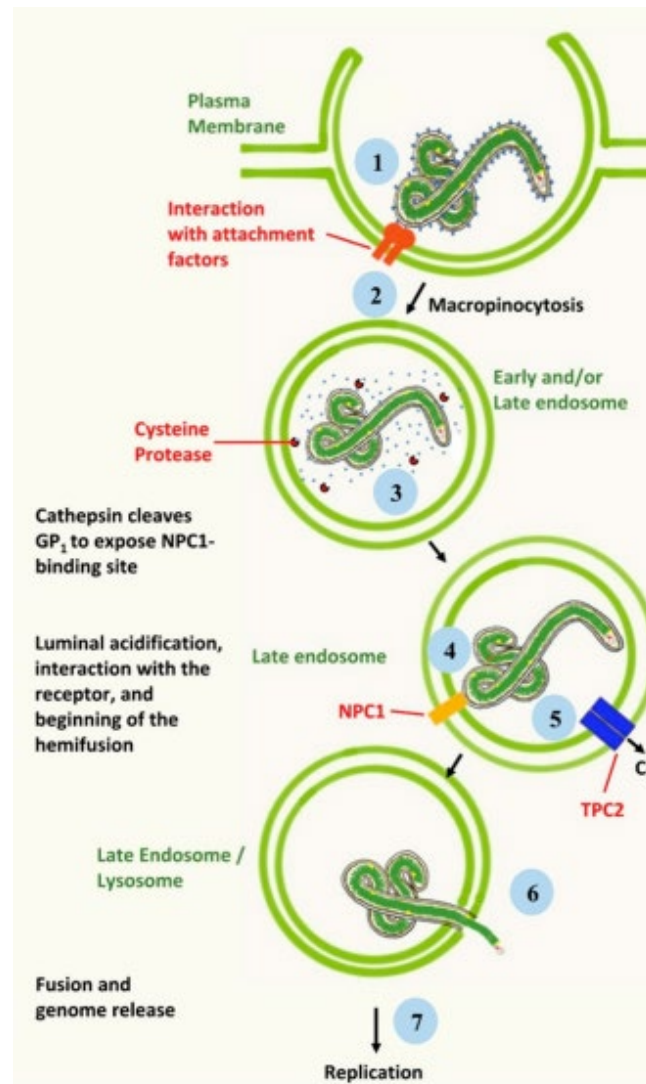


**Abbildung 7: Freilegung der Rezeptorbindedomäne durch Cathepsin Spaltung**

Die Spaltung durch Cathepsin entfernt die Glykan-Kappe und die Mucin-ähnlichen Domänen, was die Rezeptorbindedomäne von GP1 freilegt (geändert nach (Lee und Saphire 2009a)).

Die Rezeptorbindedomäne von GP1 kommt zum Vorschein, was zur Interaktion mit der hauptsächlich hydrophobischen Tasche des N-Terminus vom endosomalen Rezeptor NPC1 führt. NPC1 ist ein Rezeptor mit mehrfachen Transmembrandomänen, welcher nur in den Membranen von späten Endosomen und Lysosomen vorkommt. Normalerweise sorgt NPC1 für die Homöostase von Cholesterin zwischen den Endosomen/Lysosomen und Membranen wie der Plasmamembran oder dem ER (Martin et al. 2016).

Durch die Interaktion von GP1 und NPC1 werden die GP2 Heptad-Regionen umorganisiert, wodurch das Fusionspeptid nach außen gelangt, um sich in der Wirtsmembran zu verankern. Durch das Formen einer intermediären Prä-Hairpin-Konformation wird die Membran-Doppelschicht der späten Endosomen/Lysosomen destabilisiert und eine Fusionspore geöffnet. Die Bindung an NPC1 und die Aktivierung des Zwei-Poren Kalzium-Kanals 2 (*Two-Pore-Calcium-Channel 2-TPC2*) führt zum Entlassen der viralen Nukleokapside aus den späten Endosomen/Lysosomen in das Zytosol der Zelle (Martin et al. 2016) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ebolavirus-Zelleintritts**

Nachdem das Ebolavirus an Zelloberflächenproteine gebunden hat, wird es durch den Prozess der Makropinozytose in die Zelle aufgenommen (1). Innerhalb des Endosoms wird das Ebolavirus-Glykoprotein von Cathepsinen gespalten (2). Die Spaltung sorgt dafür, dass die NPC1-Bindestelle des Glykoproteins freigelegt wird und das Glykoprotein an den NPC1-Rezeptor binden kann (4). Diese Bindung und die Aktivierung des Zwei-Poren-Kalzium-Kanals 2 (*Two-Pore-Calcium-Channel 2*-TPC2) (5) sorgen dafür, dass die Ebolavirus-Hülle mit der endosomalen Membran fusionieren kann (6), das virale Genom in das Wirtszell-Zytoplasma entlassen, und die Transkription und Replikation vollzogen werden kann (Salata et al. 2019a).

## 1.2 Ebolavirus-Therapien

Während des großen Ausbruchs von 2014 - 2016 mit fast 50% Mortalitätsrate wurde sehr intensiv nach Therapien gegen das Ebolavirus geforscht. Die rasche Ausbreitung innerhalb des afrikanischen Kontinents, aber auch auf den anderen Kontinenten, erhöhte die Nachfrage nach Ebolavirus-Therapien. Während des großen Ausbruchs wurden vor allem die Symptome wie Fieber, Erbrechen und Durchfall behandelt. Es wurde zusätzlich Flüssigkeit und Elektrolyte verabreicht, sowie Sauerstofftherapien zur Verfügung gestellt. Allerdings war dies oft nicht ausreichend, weshalb die Suche nach einer effizienten Therapie mit wenig Nebenwirkungen begann. Das Ebolavirus kann sich sehr schnell im Körper ausbreiten. Damit es nicht dazu kommt, sollte der erste Schritt des Ebolavirus-Replikationszyklus, nämlich der Eintritt des Ebolavirus in die Zelle verhindert werden. Der Fokus lag dabei vor allem auf Cocktails von monoklonalen Antikörpern, die das Glykoprotein des Ebolavirus binden, wodurch ein Zelleintritt nicht mehr möglich war (1.2.1). Es wurde aber auch intensiv nach kleinen Molekülen gesucht, die den Zelleintritt hemmen können (1.3).

### 1.2.1 Zugelassene Ebolavirus-Zelleintrittshemmer

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der aus drei monoklonalen Antikörpern bestehende Cocktail ZMapp Nichtmenschliche-Primaten (*Non Human Primates*-NHP) zu 100% nach einer Ebolavirus-Erkrankung heilen konnte, wurde intensiver an monoklonalen Antikörpern geforscht (Qiu et al. 2014b).

Antikörper bestehen aus einer variablen antigenbindenden Fab-Region und einem konstanten Fc-Teil. Antikörper führen ihre neutralisierende Funktion aus, indem sie z.B. an das Antigen eines Virus binden und somit die Infektion blockieren. Mit ihrem Fc-Teil binden Antikörper an virale Partikel oder infizierte Zellen, was somit zu zytotoxischen und phagozytotischen Effektorfunktionen führt (Murphy et al. 2009).

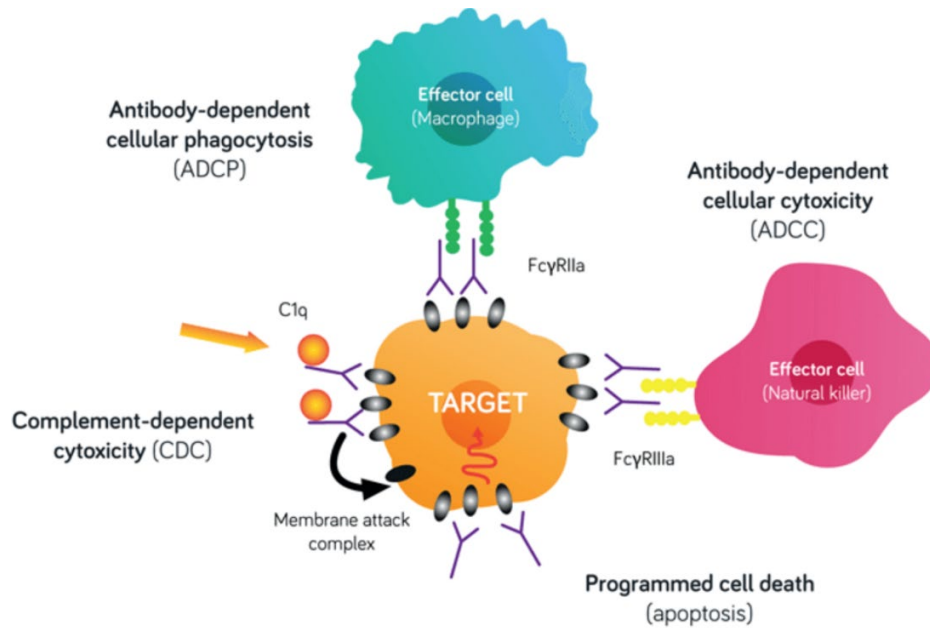
Bereits 2014 wurde mit monoklonalen Antikörpern wie ZMapp Studien an Ebola-Infizierten durchgeführt. Mit monoklonalen Antikörpern wie der Antikörper-Cocktail REGN-EB3 (Regeneron) und mAb114 (Ridgeback) wurden in den letzten beiden Ausbrüchen von 2018 und 2020 Ebolavirus-Infizierte behandelt. REGN-EB3 (Inmazeb®) und mAb114 (Ebanga™) sind seit 2020 von der Food and Drug Administration-FDA zugelassene Ebolavirus-Medikamente.

ZMapp ist ein Cocktail aus 3 humanisierten neutralisierenden Maus-Antikörpern: c13C6 von MB-003, c2G4 und c4G7. ZMapp wurde während der Ebolavirus-Epidemie den Patienten ohne

vorherige Zulassung verabreicht. Die drei monoklonalen Antikörper binden an verschiedene Regionen des Ebolavirus-Glykoproteins. c13C6 bindet an die Glykan-Kappe, während c2G4 und c4G7 an die Basis des membrangebundenen Glykoproteins binden (Tran et al. 2016). Das Besondere an ZMapp ist, dass es über grüne Gentechnik in den Pflanzen *Nicotiana benthamiana* hergestellt wird (Zhang et al. 2014). ZMapp konnte einen vollständigen Schutz gegen das Ebolavirus in Rhesus Makaken erzeugen. Allerdings war der Schutz nur gegen das Zaire-Ebolavirus effektiv und zeigte keine Kreuzreaktion mit anderen Virusstämmen (Trad et al. 2017; Qiu et al. 2014a). Ein weiteres Problem mit ZMapp ist die dauerhaft benötigte Kühlung dieser Antikörper. Eine Unterbrechung der Kühlkette kann einen Funktionsverlust zur Folge haben. Da dieses Medikament jedoch vor allem in heißen Ländern verabreicht wurde, konnte eine Einhaltung der Kühlkette nicht immer gewährleistet werden (Dhama et al. 2018). Zusätzlich muss es in mehreren Dosen über mehrere Stunden intravenös unter der Kontrolle von medizinischem Personal verabreicht werden, was bei einer Epidemie mit mehreren tausend Patienten am Tag zu großen Problemen führt (Dhama et al. 2018). Aus diesem Grund wurde nach Alternativen gesucht.

Seit Oktober 2020 ist das erste Ebolavirus-Medikament unter dem Namen Inmazeb® (REGN-EB3) von der FDA zugelassen (FDA, 2020). Dabei handelt es sich um einen Mix aus drei verschiedenen monoklonalen IgG1 $\kappa$  Antikörpern: Atoltivimab, Maftivimab und Odesivimab-ebgn. Sie wurden durch Immunisierung von VelocImmune Mäusen (dies sind Mäuse, in dessen DNA die variablen Gensegmente des humanen Antikörpers kodiert ist) (Regneron Pharmaceuticals, Inc) erhalten. Alle drei Antikörper binden an verschiedene Teile des Glykoproteins. Atoltivimab bindet an die Glykan-Kappe des Ebolavirus-Glykoproteins und zeigt neutralisierende Funktionen. Atoltivimab zeigt aber auch Fc $\gamma$ IIIa Signalaktivitäten (go.drugbank.com). Bei Fc $\gamma$ IIIa Signalaktivitäten handelt es sich um eine antikörperabhängige-zellvermittelte Zytotoxizität (Abbildung 9). Dabei binden Immunzellen wie NK-Zellen an die Fc-Region eines an einer Zielzelle gebundenen Antikörpers, wodurch eine Signalaktivierung ausgelöst wird (Murphy et al. 2009). In Fall von Atoltivimab bindet Atoltivimab an das Glykoprotein des Ebolavirus, welches bereits an eine Zielzelle gebunden hat. Anschließend binden Immunzellen mit ihrer Fc $\gamma$ IIIa (auch bekannt als CD16) an die Fc-Region von Atoltivimab, wodurch es zur Ausschüttung von Interferon  $\gamma$  und Perforin oder Granzymen kommt, was zur Lyse oder Apoptose der Zielzelle führt (go.drugbank.com).





#### Abbildung 9: Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

Durch die Bindung eines Antikörpers an die Zielzelle, binden zusätzliche Effektorzellen (rosa) (Natürliche Killerzellen-NK) mit dem FcγIIIa an die Fc-Region des gebundenen Antikörpers und lösen eine Reihe von Effektorfunktionen wie die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen aus, wodurch es zum programmierten Zelltod (Apoptose) kommt. Es kann durch einen gebundenen Antikörper aber auch zur Antikörperabhängigen Phagozytose (*Antibody dependent cellular phagocytosis*-ADCP) kommen bei der Makrophagen (grün) die tragende Rolle spielen. Zusätzlich können an eine Zielzelle gebundene Antikörper auch zur Komplementär-abhängigen Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*-CDC) führen (geändert nach themedicinemarker.com).

Maftivimab, ein weiterer monoklonaler Antikörper in Inmazeb®, bindet an die Basis des Glykoproteins und hat eine neutralisierende Wirkung. Odesivimab bindet in der Nähe des Glykoprotein-Kopfs bindet aber auch die Glykan-Cap. Odesivimab hat aber keine neutralisierende Funktion, sondern nur eine FcγIIIa-Effektorfunktion (go.drugbank.com).

Inmazeb® konnte in der klinischen Studie PAmoja TuLinde Maisha (PALM ["zusammen retten wir leben" in Kiswahili]), die Mortalitätsrate von 51% (Placebo-erhaltende Ebolavirus-Infizierte) auf 33,8% (Inmazeb®-erhaltende Ebolavirus-Infizierte) senken. Bei dieser Studie wurden 681 Ebolavirus-Infizierte neben Inmazeb® auch mAb114, ZMapp und Remdesivir verabreicht (Markham 2021).

Nebeneffekte bei der Verabreichung von Inmazeb® waren vor allem Fieber, Herzrasen, Kurzatmigkeit und Erbrechen. Die genannten Symptome kommen auch bei einer Ebolavirus-Infektion vor und müssen beobachtet und ähnlich wie bei einer Ebolavirus-Infektion behandelt werden.

Seit Dezember 2020 wurde der monoklonale Antikörper mAb114 unter dem Namen Ebanga™ zugelassen. Dieser Antikörper wurde von immortalisierten B-Zellen eines Ebolavirus-Überlebenden des Ebolavirus-Ausbruchs von 1995 in Kikwit (Demokratische Republik des Kongo) isoliert und auf CHO-Zellen vermehrt. Ebanga™ bindet an ein Epitop zwischen der Glykan-Cap und der Glykoprotein-Basis. Ebanga™ kann an das Cathepsin-gespaltene-Glykoprotein binden und verhindert somit die Interaktion mit dem NPC1-Rezeptor (Misasi et al. 2016). Ebanga™ hat den Vorteil gegenüber Inmazeb®, dass es sehr stabil ist und in einer Dosis verabreicht werden kann.

In der PALM-Studie von 2018-2019, wurde Ebanga™ Ebolavirus-Patienten verabreicht von denen 35,1% starben im Gegensatz zu 49,4% aus der Kontrollgruppe. Nebenwirkungen waren wie bei Inmazeb® Fieber, Herzrasen, Durchfall, Erbrechen und Kurzatmigkeit. Es kamen aber auch niedriger Blutdruck hinzu (FDA, 2020).



### 1.3 Kleine Moleküle als Ebolavirus-Zelleintrittshemmer

Während der großen Ebolavirus-Epidemie von 2014 - 2016 wurde neben den monoklonalen Antikörpern auch intensiv an Zelleintrittshemmern in Form von kleinen Molekülen geforscht, die weniger starke bis gar keine Nebenwirkungen hervorrufen können. Da das Ebolavirus zu den tödlichsten und ansteckendsten Viren gehört und es bis 2019 keine zugelassene Impfung oder Therapie gab, erfolgt die Erforschung des Ebolavirus-Wildtyp ausschließlich in Laboren unter Biosicherheitsstufe 4 (BSL-Biosafety Level). Es gibt weltweit wenige BSL4 Labore, da sie im Aufbau und Aufrechterhaltung sehr aufwendig und teuer sind und das darin arbeitende Personal für die Arbeiten extra geschult sein muss. Aus diesem Grund wurde nach Alternativen zur Ebolavirus-Forschung unter BSL4-Bedingungen gesucht. Es wurde sich z.B. sogenannter Hochdurchsatzscreenings bedient (siehe 1.3.1.1), bei denen der virale Zelleintritt in Form von pseudotypisierten Vektorpartikel (1.3.1) oder Vektor-ähnlichen Partikeln untersucht werden kann (Hoenen et al. 2019). Bei diesen Hochdurchsatzscreenings, die pseudotypisierte Vektorpartikel verwenden, können Moleküle gescreent werden, die aus verschiedenen Bibliotheken stammen.

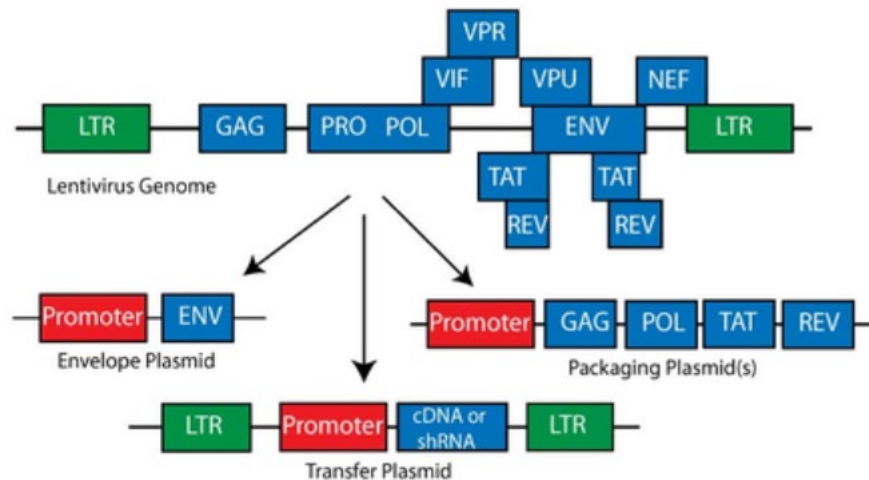
#### 1.3.1 Pseudotypisierte lentivirale Vektoren in Hochdurchsatzscreenings

Für das Arbeiten auf BSL2-Level wurden unter anderem virale Pseudotypen oder Virus-ähnliche Ebolavirus-Partikel hergestellt. Dadurch konnte das Wissen über den Ebolavirus-Replikationszyklus vertieft werden und Moleküle durch Hochdurchsatzscreening als Ebolavirus-Zelleintrittshemmer identifiziert werden.

Ein Pseudotyp ist ein Virus oder viraler Vektor, der das funktionale Hüllprotein eines heterologen Virus exprimiert. Im Falle der Ebolavirus-Pseudotypen wird das Ebolavirus-Glykoprotein in Rhabdoviren oder Retroviren eingebaut. Aufgrund der Fähigkeit, dass Rhabdoviren und Retroviren den Prozess des viralen *Buddings* unabhängig vom viralen Hüll-Glykoproteins durchführen können, werden die eben genannten Viren für die Pseudotypisierung bevorzugt verwendet.

In dieser Arbeit wurde mit auf Retroviren-basierten pseudotypisierten Vektorpartikeln gearbeitet. Retroviren können ihr Genom stabil in die Chromosomen von infizierten Zellen integrieren. Diese Integration gewährleistet die stabile Expression von Fremd-Proteinen. Die integrierten Fremd-Gene werden somit nach Replikation an die Tochterzellen weitergegeben. Die am meisten adaptierten und verwendeten retroviralen Vektoren sind die auf HIV-1-

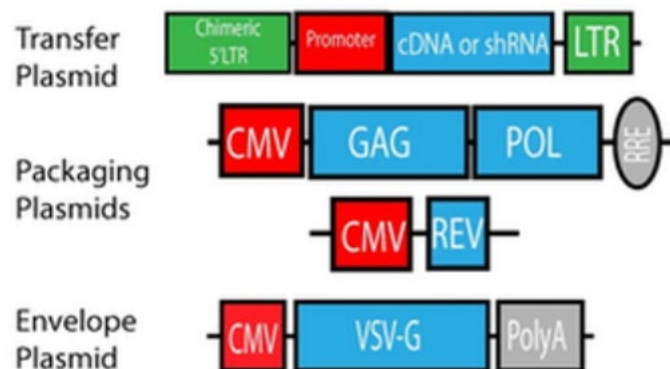
basierenden lentiviralen Vektoren. Sie können sowohl sich teilende als auch nicht teilende Zellen transduzieren. Das HIV-1-Genom besteht aus 9 offenen Leserahmen, die mindestens 15 verschiedene Proteine kodieren. Die *cis*-agierenden Elemente, wie die *Long-Terminal Repeats* (LTR), TAT-Aktivierungs-Region, der Splice-Donor und Akzeptor-Stellen, Verpackungs- und Dimerisierungssignal, Rev-responsive-Element (RRE) und der zentrale und Terminale Polypurin-Trakt (PPT)<sup>2</sup> werden für die Integration des Transgens in das Wirtszell-Genom benötigt, während *trans*-agierenden Sequenzen wie gag, pol, rev für die virale Partikelproduktion, Infektion und Integration benötigt werden. Die *cis*- und *trans*-agierenden Elemente müssen auf verschiedene Plasmide gebracht werden, um einen sicheren, replikationsdefizienten lentiviralen Vektor zu erhalten (Kim et al. 1998). Bei der Produktion von lentiviralen Partikeln werden verschiedene Plasmide benötigt: ein Transferplasmid, ein (2. Generation) (Abbildung 10) oder zwei Verpackungsplasmid(e) (3. Generation) (Dull et al. 1998b) (Abbildung 11) und ein Hüllplasmid. Die Verpackungsplasmide kodieren für die *trans*-agierenden Faktoren gag (kodiert u.a. für das Matrixprotein), pol (kodiert für die reverse Transkriptase) und rev (Regulation der Genexpression). Das Verpackungsplasmid kodiert für einen gag-pol-Vorläufer, welches in die Integrase, Reverse Transkriptase und strukturelle Proteine prozessiert wird. Die strukturellen Proteine werden für die Partikelproduktion benötigt. Rev interagiert mit dem *cis*-agierenden Element (RRE) des Transfervektors, was den Export des ungespleißten Vollängen-Genomtranskript verstärkt (Tiscornia et al. 2006). Das Hüllplasmid kodiert für das virale Hüllprotein, welches untersucht werden soll. Mithilfe des Transferplasids, dem oder den Verpackungsplasmid(en) und dem Hüllplasmid können Zellen ko-transfiziert und die entstandenen pseudotypisierten lentiviralen Vektoren im Überstand geerntet werden (Abbildung 12).



**Abbildung 10: Lentivirales System der zweiten Generation**

Oben: lentivirales Genom

Unten: Aus dem lentiviralen Genom entstandene lentivirales System der zweiten Generation mit einem Verpackungsplasmid (*packaging plasmid*) was für die Proteine Gag, Pol, Rev und Tat kodiert. Die Genexpression geht von dem schwachen 5' langen terminalen Sequenzwiederholungen (*long terminal repeat*-LTR)-Promotor aus, welcher Tat für eine aktive Expression benötigt. Zusätzlich gibt es noch das Transferplasmid (*transfer plasmid*) mit dem zu exprimierenden Gen (cDNA oder shRNA) und das Hüllplasmid (*envelope plasmid*), welches für das Hüllprotein kodiert (geändert nach Addgene).

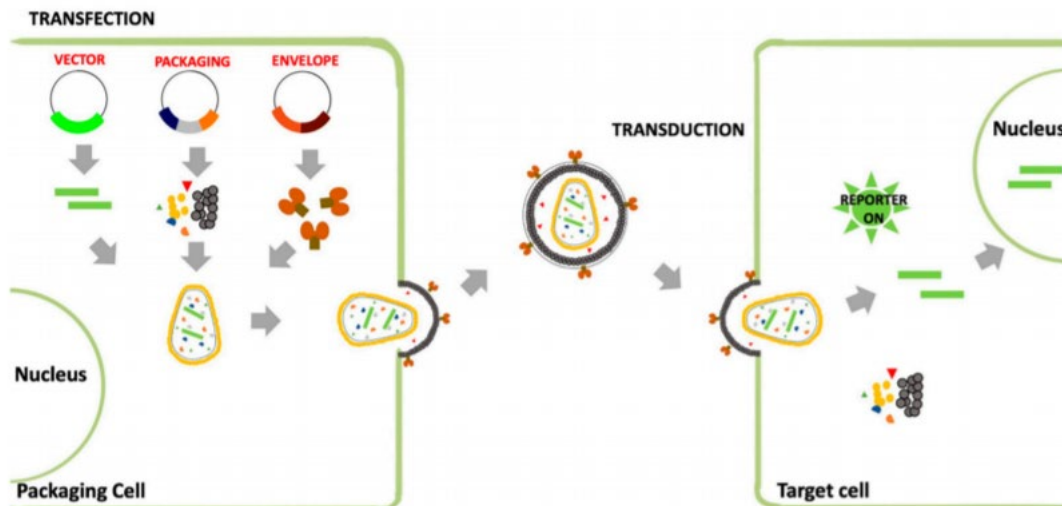


**Abbildung 11: Lentivirales System der dritten Generation**

Das lentivirale System der dritten Generation hat zwei Verpackungsplasmide (*packaging plasmid*) von denen eins für Gag und Pol kodiert und das andere für Rev. Auf dem Transferplasmid (*transfer plasmid*) wurde ein chimerischer 5'-LTR-Promotor, der mit einem heterologen Promotor fusioniert ist, eingebaut. Zusätzlich wird das Hüllplasmid (*envelope plasmid*) mit einem Zytomegalie-Virus (*Cytomegalo Virus*-CMV)-Promotor, dem Hüllprotein (hier VSV-G) und einem PolyA-Schwanz benötigt (geändert nach Addgene).

Page et al. waren die ersten, die HIV-1-basierte Vektorpartikel mit einem heterologen Glykoprotein kreierte haben (Page et al. 1990). Dabei wurde ein pseudotypisierter Vektorpartikel entwickelt, welche anstelle der Glykoprotein-kodierenden-Sequenz gp160 eine Guanin-

Phosphoribosyl-Transferase (*Guanine Phosphoribosyl Transferase-gpt*) hat und dessen Expression unter den Simian Virus (SV) 40-Promotor gebracht wurde. Der Vektor wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid MLV-GP zu Affenzellen gegeben. Danach erfolgten weitere Pseudotypisierungen von HIV-gpt mit dem ektotropischen MLV-GP und dem humanen T-Zell Leukemie Virus Typ I (human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I), welche durch die Pseudotypisierung Mensch -, und Mauszellen infizieren konnten (Landau et al. 1991). Der am häufigsten verwendete pseudotypisierte lentivirale Vektor wird mit dem Vesikuläres-Stomatitis Virus (*Vesicular-Stomatitis-Virus-VSV*)-Glykoprotein (VSV-G) pseudotypisiert, da er einen sehr breiten Wirtstropismus hat und die resultierenden Vektorpartikel sehr stabil sind. VSV-G werden sehr häufig als Standard für die Effizienz von anderen pseudotypisierten Vektorpartikeln genutzt (Cronin et al. 2005).



**Abbildung 12: Produktion von pseudotypisierten lentiviralen Vektoren**

Ein Transferplasmid (*vector*) mit Transgen (hier ein Reportergen) und *cis*-agierenden Sequenzen, ein Verpackungsplasmid (*packaging*) und ein Plasmid, welches das heterologe Hüllprotein (*envelope*) kodiert, werden verwendet, um Zellen zu transfizieren. Diese Ko-Transfektion führt zu pseudotypisierten lentiviralen Partikeln, die Zielzellen transduzieren können (geändert nach (Salata et al. 2019b).

### 1.3.1.1 Hochdurchsatzscreenings

Für Hochdurchsatzscreening werden vor allem Microtiter-Platten im 384- bis 1536-Format verwendet. Der Vorteil dieser Screenings ist, dass hiermit der antivirale Effekt von hunderttausenden Molekülen in einem Assay untersucht werden kann. Es werden zwei verschiedene Formen von Hochdurchsatzscreenings unterschieden: biochemische und zellbasierte Assays.

Bei den biochemischen Assays handelt es sich um die Messung von enzymatischer Aktivität von Kinasen, Proteasen, Transferasen und Rezeptor-Ligand-Bindung (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ionenkanäle und nukleäre Rezeptoren). Bei den biochemischen Assays werden die enzymatische Inhibierung eines Zielproteins oder Rezeptor-Ligand-Bindung untersucht. Das Problem von biochemischen Hochdurchsatz-Assays ist, dass dabei rekombinante Proteine untersucht werden und dieses ein sehr aufwendiger Prozess ist. Manche Proteine lassen sich gar nicht oder sehr schlecht rekombinant herstellen. Zusätzlich handelt es sich bei biochemischen Assays um ein sehr künstliches System ohne Bezug auf gewebespezifische Antworten. Aus diesem Grund werden zellbasierte Assays bevorzugt. Zellbasierte Hochdurchsatzscreenings können in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt werden: Secondmessenger-Assay, Reporterassays und Zellproliferationsassays.

Mit Secondmessenger-Assays werden vor allem Ionenkanalaktivierung oder Zell-Rezeptoren untersucht. Dabei werden fluoreszierende Moleküle verwendet, die z.B. auf die Veränderung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reagieren.

Bei Reporterassays werden Reporterprodukte wie Enzyme (*firefly*-Luziferase) oder das grün fluoreszierende Protein (*Green Fluorescent Protein*-GFP) für einen farbmetrischen, fluoreszierenden oder lumineszierenden *Read-out* verwendet. In den Reporterassays wird ein Reporter an ein zu untersuchendes Gen gekoppelt. Reportergene können wie oben erwähnt fluoreszierende Proteine wie GFP sein, welches durch die Anregung von Licht mit einer Wellenlänge von 455nm fluoresziert. Es kann sich aber bei Reportergenen auch um Enzyme wie die Luziferase handeln. Diese oxidieren das zugegebene Luziferin, was zur messbarer Lichtproduktion führt. (Zheng et al. 2013). Zellbasierte Lumineszenzassays sind besonders beliebt, da das Luziferase-Signal sehr stabil ist. Auch in der hier vorliegenden Arbeit, wurde ein zell-basierte Luziferase-Assay verwendet, der die neutralisierende Wirkung von antiviralen Molekülen testet. Hierbei werden die Gene des zu untersuchenden Virusmoleküls zusammen mit einem Reporter in die Zelle eingebracht. Diese sogenannte „Transduktion“

erfolgt mithilfe der oben erwähnten (Abbildung 12) pseudotypisierten Transfervektoren, auch „Genfähren“ genannt (Abel et al. 2011). Nur wenn es dem pseudotypisierten Vektorpartikel möglich ist in die Zelle zu gelangen, kann das Luziferase-Gen exprimiert werden, das Luziferinsubstrat oxidiert und somit Lumineszenz gemessen werden (Weber et al. 2014). Mit Luziferase-basierten Assays kann außerdem die Zellviabilität analysiert werden. Das Substrat Luziferin kann nur mithilfe von ATP und der Luziferase oxidiert werden. Ein Lumineszenz-Signal kann also nur gemessen werden, wenn ATP, der Hauptenergieträger der Zelle, in der Zelle vorhanden ist (Lomakina et al. 2015).

### 1.3.2 Potentielle Ebolavirus-Zelleintrittshemmer

Während der Ebolavirus-Epidemie von 2014 - 2016 wurden neben kleinen Molekülen aus verschiedenen Bibliotheken auch bekannte, von der FDA zugelassene Medikamente nach Ebolavirusspezifischer Hemmung in Hochdurchsatzscreenings untersucht. Dabei wurden z.B. die Moleküle MLS0000078751 und MLS000534476 identifiziert. Sie wurden über einen Hochdurchsatzscreen mit 319855 kleinen Molekülen aus der „Molecular Libraries Small Molecule Repository-Bibliothek“ als Inhibitoren der Ebolavirus-Bindung an Zelloberflächen identifiziert. Zwei weitere Moleküle sind MLS000394177 und MLS000733230, die als Hemmer der Makropinozytose gelten. *In vitro* Studien zeigten einen starken Effekt als Hemmer gegen den Zelleintritt, allerdings gibt es noch keine *in vivo* Studien darüber (Anantpadma et al. 2016).

Weitere Moleküle konnten erfolgreich als *in vitro* Ebolavirus-Zelleintrittshemmer erkannt werden. So z.B. Medikamente, die am Zelleintritt ansetzen sind z.B. Phosphatidylinositol-3-phosphat-5-Kinase-(PIKfyve) Agonisten wie Apilimod. Apilimod kann das Wandern der viralen Partikel von EBOV zu NPC1-enhaltenden Endosomen *in vitro* verhindern (Nelson et al. 2017). Aber auch die FDA-genehmigten Medikamente Colchizin, Sunitinib und Erlotinib konnten den Transport und die Reifung von Endolysosomen verhindern und somit auch den Eintrittsprozess des Ebolavirus *in vitro* unterbinden (Dyall et al. 2018; Anantpadma et al. 2016). Allein zeigten diese Moleküle keinen Effekt im Mausmodell, aber zusammen konnte ein moderater Schutz erreicht werden (Bekerman et al. 2017). Allerdings liegen noch keine weiteren Daten bzw. klinische Studien zu diesen Medikamenten vor.

Tetrandrine, ein Alkaloid aus Pflanzen wie *Stephania tetrandra* blockiert den für den Ebolavirus-Zelleintritt wichtigen Rezeptor TPC2 (Abbildung 8). Dies konnte auch in Mausmodellen bestätigt werden (Simmons et al. 2016). Weitere Studien an NHP oder Menschen sind nicht bekannt.

Ein weiterer wichtiger Schritt im Ebolavirus-Zelleintritt ist die Spaltung des Ebolavirus-Glykoproteins durch Cathepsin. Hemmer von Cathepsin wie z.B. AMS36 (Epoxy succinat-Hemmer)-Derivate zeigten sich *in vitro* als sehr effektiv und werden nun in Tiermodellen getestet (van der Linden et al. 2016).

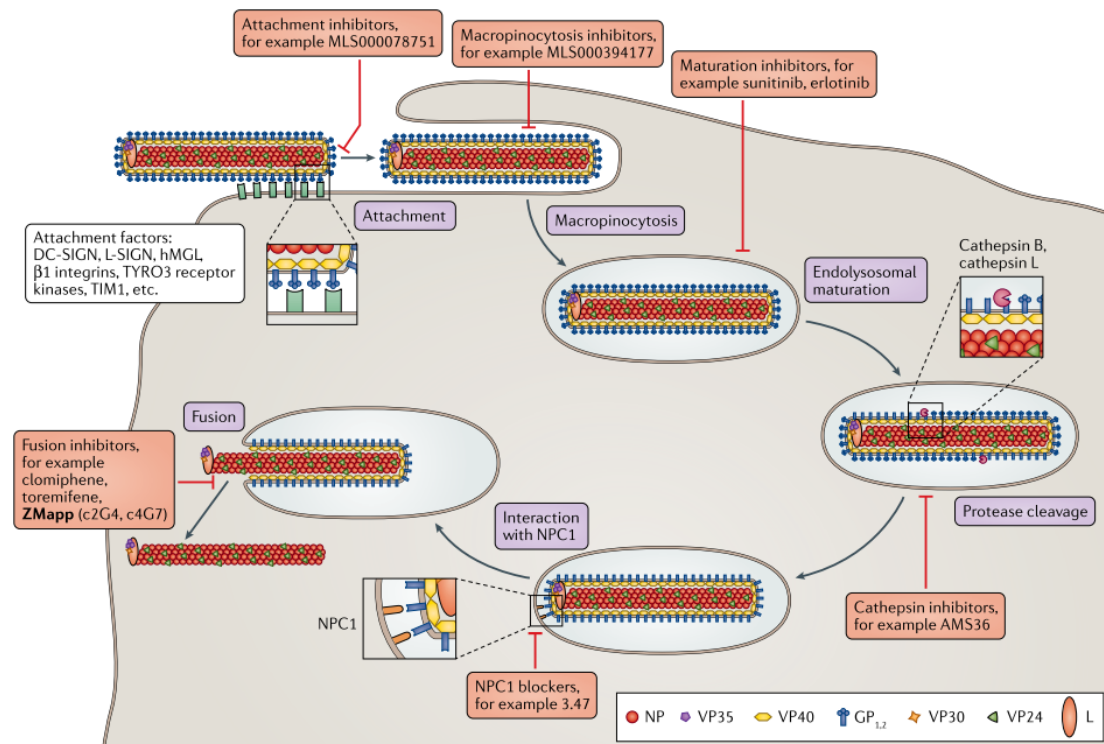
Das Adamantane Dipeptide Piperazine 3.47 konnte die Interaktion des Ebolavirus-Glykoproteins mit dem NPC1 verhindern. Dieses Molekül zeigte sich aber als nicht geeignet

für *in vivo* Studien, da es schnell von den hepatischen Mikrosomen degradiert wird (Côté et al. 2011). Es wurde Derivat des 3.47 hergestellt, die in Maus-Plasmazellen und hepatischen Mikrosomen deutlich stabiler sind und nun *in vivo* getestet werden können (Liu et al. 2018).

Es gibt auch Moleküle wie z.B. die als Östrogenrezeptormodulatoren bekannten Moleküle Toremifene und Clomiphene, die die Präfusion des Ebolavirus-Glykoproteins destabilisieren. Clomiphene zeigte eine Überlebensrate von 90% im Mausmodell, während Toremifene nicht oder nur moderat wirkte (Johansen et al. 2013; Zhao et al. 2016). Clomiphene kann in Gewebe des Auges oder Hoden eindringen, was es vor allem für Ebolavirus-Überlebenden zu einem attraktiven Therapeutikum macht. Wie bereits erwähnt (siehe 1.1.2), kann Ebolavirus in Geweben des Auges, was zur Sehbehinderung führt, aber auch in Hoden bis zu 9 Monate nach Infektion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund kann ein Therapeutikum, was in diese Gewebe eindringen und hemmend gegen das Ebolavirus wirkt, sehr sinnvoll sein.

Suramin, ein kompetitiver Inhibitor von Heparin wurde als Ebolavirus-Zelleintrittshemmer identifiziert (Henß et al. 2016). Bei Suramin handelt es sich um ein Medikament, welches bei der durch Trypanosomen ausgelösten afrikanischen Blindheit zum Einsatz kommt. Allerdings löst Suramin starke Nebeneffekte aus wie Erbrechen, Übelkeit, Nesselsucht, aber auch Leberschäden, Knochenmarksschäden bis hin zum Tod. Aus diesem Grund sollte Suramin nur bei tödlichen viralen Erkrankungen verabreicht werden, für die es keine Alternativen gibt.





**Abbildung 13: Ebolavirus-Zelleintrittsinhibitoren**

Dargestellt ist der Ebolavirus-Zelleintritt, welcher mit der Anhaftung des Ebolavirus an verschiedene Zellrezeptoren wie DC-SIGN, L-SIGN, hMGL,  $\beta 1$ -Integrine TYRO3-Rezeptorkinasen TIM1 etc erfolgt. Anschließend wird das Ebolavirus durch Makropinozytose in die Zelle aufgenommen. Innerhalb der Endolysosomen kommt es zur Proteasespaltung und zur Interaktion mit NPC1. Daraufhin fusioniert das Virus mit der endolysosomalen Membran und wird über Abkapselung aus der Zelle entlassen (Hoenen et al. 2019). Viele dieser hier aufgeführten Schritte können mit verschiedenen kleinen Molekülen (siehe 1.3.2), die unter anderem in Hochdurchsatzscreenings identifiziert worden sind, blockiert werden (geändert nach (Hoenen et al. 2019)).

## 1.4 Impfungen-Prävention viraler Infektionen

Bei einer Impfung soll der Geimpfte gegen eine Infektionskrankheit geschützt werden. Dabei kann der Geimpfte mit toten oder abgeschwächten, noch replikationsfähigen Organismen (aktive Impfung) oder mit Antikörpern gegen eine übertragbare Krankheit (passive Impfung) geimpft werden. Eine neue Technologie der Vakzinierung besteht aus der Impfung von messenger RNA (mRNA), bei dem die Immunzellen das aus der mRNA hergestellte Protein über den MHC I-Komplex präsentieren und dabei eine Immunantwort auslösen (Pardi et al. 2018). Bei der Impfung mit toten oder abgeschwächten noch replikationsfähigen Organismen aber auch bei der mRNA-Vakzinierung ist es wichtig, dass das Immunsystem so „trainiert“ wird, dass bei Infektion mit dem richtigen Erreger eine schnelle Reaktion und somit eine Eliminierung des Erregers oder nur ein schwacher Ausbruch der Krankheit erfolgt (Siegrist 2008).

Ein wirksamer Impfstoff muss verschiedene Eigenschaften besitzen. Er muss sicher sein, das heißt er darf die Krankheit nicht selbst auslösen und nicht zu starken Nebenwirkungen führen. Ein Impfstoff sollte ein langanhaltendes immunologisches Gedächtnis mit der gleichzeitigen Aktivierung von B- und T-Zellen erzeugen. Zusätzlich sollte ein effektiver Impfstoff die Produktion von neutralisierenden Antikörpern induzieren können. Wird eine hohe Anzahl von Personen innerhalb der Bevölkerung geimpft, kann es zu einem kollektiven Impfschutz kommen (Herdenimmunität). Selbst Menschen, die nicht geimpft sind, können somit vor einer Infektion geschützt werden, da die Infektion nicht weitergereicht wird (Murphy et al. 2009).

Erste Versuche mit Impfstoffen erfolgten durch Edward Jenner in einem historisch durchgeführten Experiment. Der getrocknete Inhalt einer Pustel einer an dem Pockenvirus erkrankten Person wurde einer anderen, gesunden Person verabreicht. Dies endete allerdings oftmals tödlich, da es hierbei zum Ausbruch der eigentlichen Erkrankung kam. Als Alternative injizierte Edward Jenner daher seiner Familie den Inhalt aus Pusteln seiner an Pockenviren erkrankten Kühe (Vakziniavirus). Diese für den Menschen nicht gefährliche Krankheit, löst eine kurze Infektion aus und sorgte für die Entstehung von Antigenen, die eine Immunantwort im Menschen auslösen. Ein Mensch, dem vorher die Kuhpocken injiziert wurden, konnte durch die von den Kuhpocken ausgelöste Immunantwort vor humanen Pockenviren geschützt werden. (Kreuzprotektion). Dieses historische Experiment von Jenner zeigt, dass das Immunsystem mit abgeschwächten Erregern trainiert werden kann, eine Immunantwort auszulösen, um somit den Körper vor dem krankmachenden Erreger zu schützen (Murphy et al. 2009).

Für die Entwicklung von Impfstoffen werden heute attenuierte Organismen mit abgeschwächter Pathogenität (virale oder bakterielle Impfvektoren) oder Impfstoffe auf der Basis von abgetöteten Organismen oder aufgereinigten Komponenten dieser Organismen (Untereinheitenimpfstoffe) verwendet.

Gereinigte Antigene sind nicht stark immunogen. Deshalb kann durch Zugabe von Aluminiumsalzen, Toxoiden, bakteriellen Polysacchariden, bakteriellen Hitzeschockproteinen oder bakterieller DNA (im Allgemeinen nichtinfektiöse Bestandteile von Bakterien, welche als Adjuvantien genutzt werden) das Ziel erreicht werden, dass gegen die Antigene mit denen die Adjuvantien gekoppelt sind, eine Immunantwort ausgelöst wird (Murphy et al. 2009).

Wie oben erwähnt sollten effektive Impfstoffe mehr als einen Zelltyp aktivieren. Es ist wichtig, dass nicht nur T-Zellen, sondern auch B-Zellen aktiviert werden, um Antikörper zu produzieren. Dies ist mit Konjugatimpfstoffen möglich. Dabei werden Bestandteile eines Bakteriums (Polysaccharidhülle) chemisch mit einem Proteinträgermolekül (Tetanustoxin) eines anderen Bakteriums kombiniert. Meistens wird dabei eine bereits vorhandene Immunität gegen das Proteinträgermolekül genutzt. Mit dieser Strategie werden T-Zellen aktiviert, welche das Proteinträgermolekül erkennen. Die T-Zellen wiederum aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern gegen die Bestandteile, die das Proteinträgermolekül mit sich trägt (Murphy et al. 2009).

Um eine noch bessere und effektivere Immunantwort zu erhalten, werden immer häufiger attenuierte Lebendimpfstoffe eingesetzt. Dafür werden die Viren aus dem Menschen isoliert und auf für sie artfremden Zellen weiter propagiert. Dabei entstehen Mutationen, die sie anschließend nicht mehr dazu befähigen, sich auf menschlichen Zellen zu vermehren. Bei dieser sogenannten Attenuierung ist allerdings immer das Problem, dass durch erneute Mutationen ein virulenter Stamm entstehen kann, der vor allem für immunkomprimierten Personen und Kindern ein sehr hohes Risiko darstellt. Aus diesem Grund werden nun häufig zunächst die virulenten Gene identifiziert und anschließend mithilfe von Mutagenese verändert. Die Mutationen werden dabei so erhalten, dass eine Rückmutation nicht möglich ist. Um die mutierten virulenten Gene in den Körper zu schleusen, werden die Gene in ein attenuiertes Virusgenom eingebracht (Siegrist 2008).

### 1.4.1 Zugelassene Ebolavirus-Impfstoffe

#### Ervebo

Seit 2019 der Impfstoff rVSVΔ/EBOV GP, auch bekannt unter dem Namen *Ervebo*, zugelassen. In einer Phase III Ringstudie konnten keine offensichtlichen Nebenwirkungen bei geimpften Personen festgestellt werden. Zusätzlich wurde dieser Impfstoff ohne offizielle Freigabe bereits bei dem großen Ebolavirus-Ausbruch 2014 – 2016 verabreicht (Agnandji et al. 2016).

*Ervebo* ist ein lebender replikationskompetenter Vektor, in welchem das VSV-Glykoprotein durch das Ebolavirus-Glykoprotein ausgetauscht wurde. Das Öffentliche Gesundheitsamt von Kanada (Public Health Agency of Canada) entwickelte diesen Impfstoff und er wurde anschließend von Merck weiterentwickelt.

*Ervebo* löst nach Verabreichung die Aktivierung des angeborenen Immunsystems aus. Nach kurzer Zeit werden Natürliche Killerzellen (*natural killer cells*-NK) aktiviert. GP-spezifische IgG-Antikörper entstehen 7-14 Tagen nach der Impfung. Neutralisierende Antikörper wurden nach der Impfung entdeckt sowie ein breites Spektrum von T-Zellen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in NHP nicht die T-Zellen sind, die zum Schutz führen. Auch im Menschen waren CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erst nach Verabreichung einer höheren Impfdosis nachweisbar (Monath et al. 2019). Nebenwirkungen waren Schwellung und Rötung der Einstichstelle sowie Fieber, Muskelschmerzen, Müdigkeit und Kopfschmerzen.

2014 wurde rVSV/EBOV GP für die Verwendung in gesunden Freiwilligen aus Europa, Gabon, Kenya und den USA getestet. Dort erwies sich der Impfstoff als sicher. Allerdings war dies nicht der Fall in einer anderen Studie, wo Freiwillige aus Genf damit geimpft wurden. Nach Impfung entwickelten die Freiwilligen Arthritis, weshalb die Impfstudie zunächst eingestellt wurde (Shuchman 2015). Im April 2015 wurde die Studie wiederaufgenommen und in Phase III gebracht. Im Juli 2015 konnte auch an Freiwilligen in Guinea gezeigt werden, dass der Impfstoff sehr effektiv und sicher ist. Es wurde dabei eine Ring-Impfkampagne durchgeführt bei der alle engen Kontakte von neuen Fällen entweder sofort oder nach 21 Tagen geimpft worden sind. Dabei zeigten *Ervebo*-Geimpfte einen sehr guten Schutz (Callaway 2019).

### **Ad26.ZEBOV (Zabdeno) und MVA-BN-Filo (Mvabea)**

Ein weiterer für das Ebolavirus seit 2020 zugelassener Impfstoff ist der heterologe 2-Dosen Impfstoff Ad26.ZEBOV (Zabdeno) und MVA-BN-Filo (Mvabea). Ad26.ZEBOV ist ein Impfvektor bestehend aus dem humanen Adenovirus Serotyp 26 (Ad26), welcher das Glykoprotein der Mayingavariante des Zaire-Ebolavirus exprimiert. Die *Boost*-Komponente ist der Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)–Impfvektor. Dieser besteht aus dem Glykoprotein der Variante Mayinga des Zaire-Ebolavirus, dem Glykoprotein der Gulu-Variante des Sudan-Ebolavirus, dem Nukleoprotein des Tai-Forest-Ebolavirus und dem Nukleoprotein der Musoke-Variante des Marburgvirus. MVA-BN-Filo wurde von der Bavarian Nordic entwickelt.

Nach Verabreichung der *Prime*-Komponente Ad26.ZEBOV konnten IgG-spezifische Immunantworten registriert werden, welche mit Zugabe des MVA-BN-Filo noch stärker ausfielen. Die Konzentration an neutralisierenden Antikörpern war nach Verabreichung von Ad26.ZEBOV gering, konnte aber nach Zugabe von MVA-BN-Filo am 21. Tag enorm gesteigert werden. Während CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten erst nach der Verabreichung des *boost* von MVA-BN-Filo beobachtet wurden, konnten nur geringe CD4<sup>+</sup>-T-Zellantworten erfasst werden (Anywine et al. 2019). Allerdings ist noch nicht bekannt wie lange die Immunantwort nach Impfung anhält, da der Impfstoff erst seit Juli 2020 zugelassen ist. Aufgrund der geringen Nebewirkungen wie Schmerzen und Schwellung der Einstichstelle sowie Muskelschmerzen Müdigkeit und Kopfschmerzen gilt der Impfstoff als sicher. Da es sich um die Verabreichung zweier Impfstoffdosen handelt, ist die Verabreichung bei Ausbrüchen kritisch zu betrachten, da dabei ein schneller Schutz gewährleistet werden muss, um die Ausbreitung rasch einzudämmen. Deshalb empfiehlt sich zu Zeiten von Ausbrüchen ein einziger Impfstoff, der eine starke Immunantwort auslösen kann.

Wie bereits bei den entwickelten Ebolavirus-Impfstoff Mvabea, werden immer häufiger virale Impfvektoren wie MVA für die Verabreichung von heterologen Antigen eingesetzt.

## 1.5 Impfvektoren

Virale Impfvektoren sind bereits ohne Adjuvanz sehr immunogen und sorgen für das Auslösen einer starken zytotoxischen T-Zell- und humoralen Immunantwort. Virale Impfvektoren können Gene hochspezifisch einschleusen und Antigene zu den Zielzellen (wie dendritischen Zellen) transportieren. Zusätzlich können virale Vektoren die Induktion einer langanhaltenden Immunantwort mit Gedächtnis-T-Zellen auslösen. Virale Komponenten stimulieren das angeborene Immunsystem zur Ausschüttung von Zytokinen und Interferonen (Akira et al. 2006).

Es existieren u.a. retro- oder lentivirale Vektoren, Adenovirus-basierte Vektoren, VSV-basierte Vektoren, Modifiziertes Vakziniavirus Ankara (*Modified Vaccinia Virus Ankara*-MVA)-basierte Vektoren sowie Masern-Virus (MV)-basierte Vektoren. Die Auswahl einer geeigneten Vektor-Plattform hat jedoch unter Beachtung jeweils spezifischer Herausforderungen zu erfolgen: Ein problematischer Aspekt bei dem Einsatz von retro- oder lentiviralen Vektoren ist, dass die stabile Expression des exogen eingebrachten Gens durch Integrationsmechanismen erfolgt, was wiederum zur Auslösung von Krebs führen kann. Zusätzlich ist eine bereits vorhandene Immunität gegen einige virale Vektoren (wie z.B. Adenovirus- und Masern-Vektoren) ein Problem, da damit die Effizienz des Vektors deutlich herabreguliert wird. Diese Vor-Immunität kommt dadurch zustande, dass der Körper bereits mindestens einmal mit dem unveränderten Wildtyp-Virus (Adenoviren, welche bereits oft zu Erkältungskrankheiten im Kindesalter führen oder Masernviren gegen die schon 99% der Kinder geimpft sind) in Kontakt gekommen ist und dabei neutralisierende Antikörper gebildet hat. Ein Vorteil viraler Vektoren ist aber dennoch, dass sie genetisch modifiziert oder replikationsdefizient sind, wodurch die Pathogenität enorm reduziert wird. MVA-basierte und Adenovirus-basierte Vektoren sind die am häufigsten verwendeten viralen Vektoren, da sie zu robusten Immunantworten mit spezifischen zytotoxischen T-Zellen führen (Ura et al. 2014).

## **1.5.1 Pockenvirus-basierte Impfvektoren**

### **1.5.1.1 Das Vakzinia-Virus**

Vakziniaviren wurden als erste Viren verwendet, um die von den Variolaviren ausgelöste Pockenkrankheit zu bekämpfen. Die Vakzinierung erhielt aufgrund der Vakziniaviren ihren Namen. Es gelang dem englischen Landarzt Edward Jenner 1776 mithilfe von Viren, die er aus Kühen isolierte (lat. *vacinia*=Kuh) in Menschen, vor allem Kindern, nur einen abgeschwächten Krankheitsverlauf zu erzeugen und eine lebenslange Immunität aufzubauen. 1874 entwickelte sich daraus eine weltweite Impfkampagne, die allerdings erst 1976 unter der World Health Organisation (WHO) weltweit durchgesetzt werden konnte. 1980 wurde die Welt als pockenfrei deklariert (Henderson 2011).

Pockenviren und die dazu gehörigen Vakziniaviren sind große DNA-Viren. Es handelt sich bei ihnen um sehr große, behüllte, komplexe Viren. Vakziniaviren besitzen einen hantelförmigen Kern in dem die DNA verpackt ist und auch Enzyme wie die DNA-abhängigen RNA-Polymerase und das RNA-Prozessierungs-Enzym kommen im Kern vor (Harrison et al. 2004), (Moss und Shisler 2001).

### 1.5.1.2 Replikationszyklus und Expression viraler Gene

Der Vakziniavirus-Replikationszyklus ist bis heute nicht vollständig verstanden. Nach Eintritt der Vakziniaviren (entweder durch Fusion der äußeren Virushülle mit der Zell-Plasmamembran oder durch Phagocytose und anschließender Membranfusion) in das Zytoplasma der Wirtszelle, wandert der Viruskern entlang der Mikrotubuli zur zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER). Innerhalb des verschlossenen Kerns kommt es bereits zur Synthese der ersten 100 frühen viralen Proteine. Das besondere bei Vakziniaviren ist, dass es frühe, intermediäre und späte Gene gibt, die kaskadenartig exprimiert werden. Während die frühen Proteine zu den Proteinen der DNA-Replikation, der Nukleotidsynthese, zur Kernentpackung, Freisetzung der parentalen DNA, der Gentranskription und Proteine zur Umgehung der Wirtsimmunantwort, gehören, sind die intermediären und späten Proteine für die Morphogenese und Assemblierung der Viruspartikel zuständig (Roberts und Smith 2008). Die intermediäre und späte Genexpression findet dabei ausschließlich im Zytoplasma statt, da alle dafür benötigten Enzyme bereits im Virusgenom kodiert sind. Intermediäre Gene können nur mithilfe von frühen Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren exprimiert werden und späte Gene nur mithilfe von intermediären Transkriptionsfaktoren. Damit die frühe Genexpression schon innerhalb des geschlossenen Kerns stattfinden kann, müssen aus dem vorherigen Replikationszyklus noch späte Transkriptionsfaktoren vorhanden sein, die dabei helfen die frühen Gene zu exprimieren (Roberts und Smith 2008).

Nachdem die frühen Gene exprimiert wurden, öffnet sich der Kern und die parentale DNA und die daran gebundenen Proteine werden ins Zytoplasma entlassen (Mallardo et al. 2002). Im Zytoplasma regulieren die viralen Proteine die Wirtsproteinsynthese herab. Auch die Permeabilität der Plasmamembran wird erhöht. Zusätzlich beginnen infizierte Zellen zu wandern, indem sie das Zytoskelett verändern (Bablanian et al. 1978).

Mithilfe des DNA-Protein-Komplex erfolgt die DNA-Replikation. Wie genau die DNA-Replikation stattfindet, ist noch nicht bekannt. Allerdings bilden sich an den DNA-Replikationsstellen Membranen des ERs. Die sogenannten ER-Zisternen fusionieren zu einer dichten Hülle. Damit hat es morphologische Ähnlichkeit zum Zellkern und werden virale Mini-Nuklei genannt (Tolonen et al. 2001). Nach Beenden der DNA-Replikation dissoziieren die Membranen wieder von den Replikationsstellen und es kommt zur Assemblierung neuer Viruspartikel. Es bilden sich halbmondförmige Membranen um die DNA herum. Die DNA wird somit in die Membranhülle eingebaut. Dadurch entstehen neue intrazelluläre reife Virus (*intracellular mature virus-IMV*)-Partikel, die infektiös sind (Condit et al. 2006). Ein Teil der



IMVs wird mit veränderten Golgi-Membranen umhüllt, zur Plasmamembran transportiert und durch Knospung (*budding*) als extrazelluläre umhüllte (extracellular enveloped-EEV) Viren freigesetzt.

### 1.5.1.3 Entwicklung des Impfvectors Modifiziertes Vakziniavirus Ankara (MVA)

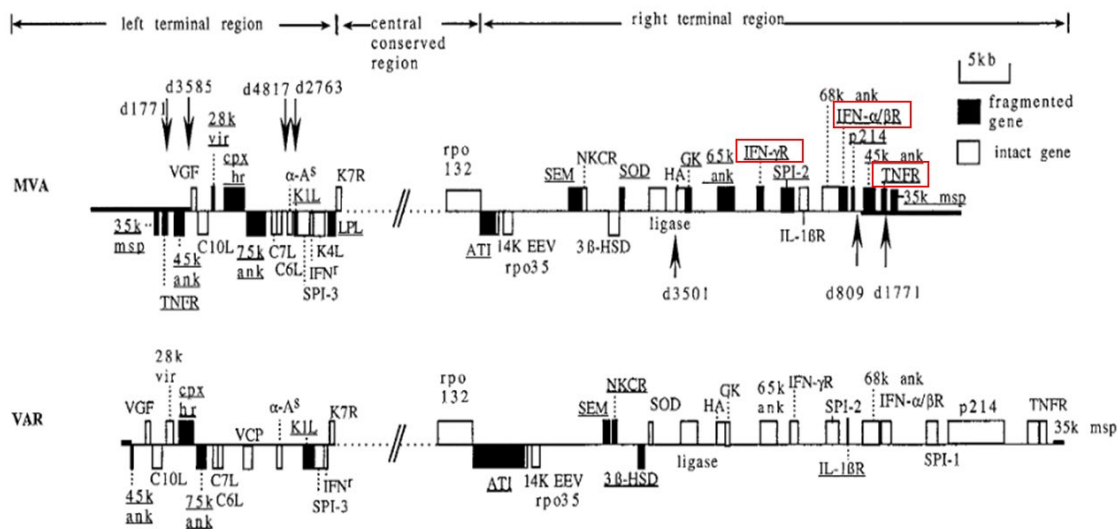
Während des Ausrottungsprogramms der Pockenkrankheit arbeiteten Münchner Forscher an einem sichereren Impfstoff als den zur Ausrottung verwendeten virulenten Vakziniavirus-Impfstoff. Dafür wurde das Vakziniavirus Ankara, welcher seinen Ursprung in der Türkei hatte, verwendet. Vakziniavirus Ankara wurde in der Türkei auf der Haut von Kälbern oder Eseln zur Pockenvirus-Impfstoffentwicklung vermehrt, wobei bereits Mutationen im Virusgenom entstanden sind. Zunächst wurde das Vakziniavirus-Ankara auf Chorioallantoismembran von embryonierten Hühnereiern kultiviert und aus diesem Grund Chorioallantois Vakzinia Ankara (CVA)-Virus genannt (Herrlich A., Mayr A. 1954). Das CVA-Virus wurde anschließend wieder auf Kälberhäuten vermehrt, um als neuer Impfvektor für die Münchner Pockenvirus-Impfkampagne 1954/55 verwendet zu werden. Allerdings folgten zusätzlich noch weitere 516 Passage auf Chickenembryo-Fibroblasten (*chicken embryo fibroblasts*-CEF) wodurch sich das ursprüngliche Vakziniavirus-Genom weiter veränderte. Folglich wurde es Modifiziertes Vakziniavirus Ankara (MVA) genannt.

Es wurde an das Bayrische Staatsministerium für Impfungen übergeben. Das Staatsministerium ließ daraufhin den zur Pockenvirus-Impfung geeigneten Impfvektor MVA testen (Stickl H. und Hochstein-Mintzel V. 1971). Es konnte auch in einem der ersten Tierversuche an Makaken Affen gezeigt werden, dass durch eine vorherige Infektion mit MVA die Affen vor der Schwere der Pockenkrankheit geschützt waren (Mayr et al. 1975; Stickl H. und Hochstein-Mintzel V. 1971).

1971 wurde MVA an Menschen getestet. Dafür wurde das Virus erst auf CEF-Zellen kultiviert und anschließend über das Skarifizieren unter die Haut gegeben. Die Geimpften zeigten nur leichte rötliche und schwellende Hautreaktionen. Erst nach erneuter Injektion des Vakziniavirus Elstree konnten die typischen Vakziniavirus-Hautreaktionen mit starker Schwellung beobachtet werden. 1977 wurde entschieden, dass MVA als erste Vorimpfung für eine Pockenvirus-Impfung verwendet werden kann. Bis 1980 wurde MVA an 120000 Menschen verabreicht (Mahnel H. und Mayr A. 1994).

Interessanterweise wurde sehr schnell erkannt, dass die typischen großen Läsionen, die Vakziniaviren an der Chorioallantoismembran nach einer Infektion verursachten, bei einer

Infektion mit MVA deutlich kleiner ausfielen (Herrlich A., Mayr A. 1954). Auch zytopathische Effekte oder die Ausbildung von Plaques in verschiedenen Gewebekulturen fehlten nach einer MVA-Infektion. Dies sprach alles für den Verlust der Virulenz bei MVA (Mayr A 1964; Stickl H. und Hochstein-Mintzel V. 1971). Es konnte gezeigt werden, dass durch das mehrmalige Passagieren MVA 15% des parentalen viralen Genoms (ca. 30 kb) verloren hat. Unter diesen Genen befinden sich *host-range* Gene, Gene, die für Virus-Wirts-Interaktion-Proteine kodieren und virale immunmodulatorische Gene (Sutter und Moss 1992). Die vakziniaviralen immunmodulatorischen Gene sind unter anderem Rezeptoren, die lösliche Proteine, wie Interferone, Chemokine oder Zytokine binden und diese damit inaktivieren (Volz und Sutter 2017). Dabei handelt es sich um Rezeptoren für den Tumour-Nekrose-Faktor (TNF) (Hu et al., 1994; Smith et al., 1996), Interferon (IFN)- $\gamma$  (Alcami & Smith, 1995; Mossman et al., 1995) und IFN- $\alpha/\beta$  (Colamonici et al., 1995; Symons et al., 1995). Die Gene für die hier aufgeführten Rezeptoren sind in MVA-Genom nicht mehr erhalten, was unter anderem zu dessen Avirulenz beiträgt (Blanchard et al. 1998) (Abbildung 14).

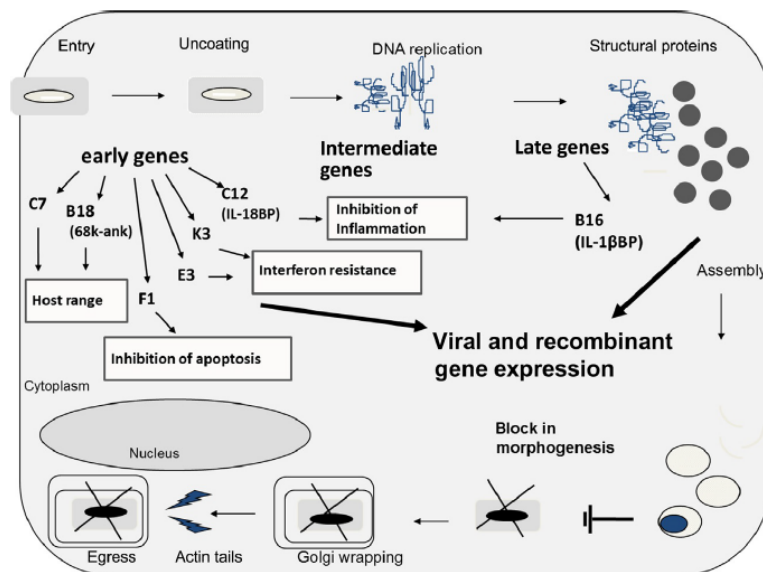


**Abbildung 14: Darstellung des MVA- und des Pockenvirus (VAR) -Genoms**

Dargestellt sind die Unterschiede der Genome von MVA (oben) und Pockenviren (unten), die nach mehrmaligem Passagieren auf CEF-Zellen entstanden sind. Schwarz: fragmentierte Gene, weiß: intakte Gene, rot markiert: immunmodulatorische Pockenvirus-Proteine, die im MVA-Genom fragmentiert sind (geändert nach (Antoine, G., et al. 1998)).

#### 1.5.1.4 MVA-Replikation

MVA kann in CEF und Baby Hamster Leberzellen (*Baby Hamster Kidney cells*-BHK) permissiv wachsen. In Zellen humanem Ursprungs zeigt sich allerdings ein abortiver Replikationszyklus ohne infektiöse Partikel (Drexler et al. 1998). Während die Expression der frühen Gene, ähnlich wie bei einer Wildtyp-Vakziniavirus-Replikation, im Kern abläuft (1.5.1.2), kommt es nach der Entpackung des Kerns in vielen Zellen humanen Ursprungs zur viralen DNA-Replikation und der Expression von intermediären und späten Genen (Abbildung 15). Die halbmondförmigen Membranen entstehen, können aber aufgrund der in MVA fehlenden Gene nicht mehr mit den viralen Kernproteinen interagieren. Somit entstehen keine IMVs wie bei einer Wildtyp-Vakziniavirus-Infektion (siehe 1.5.1.2) (Sancho et al. 2002). Obwohl MVA einen abortiven Replikationszyklus in Zellen humanen Ursprungs hat, kann es dennoch dort effizient Proteinsynthese durchführen (Sutter und Moss 1992).



**Abbildung 15: Replikationszyklus von MVA in den meisten Säugerzellen**

MVA kann durch Endozytose in die Wirtszelle gelangen und dort mit ihrem kaskaden-ähnlichen Lebenszyklus beginnen. Innerhalb des Zytoplasmas der Zelle beginnt MVA mit der Freisetzung seines Genoms und der Expression der frühen Gene. Anschließend kommt es zur DNA-Replikation und daraufhin zur Expression der intermediären Gene. Erst wenn die intermediären Gene exprimiert wurden, können die späten Gene, welche für strukturelle Proteine kodieren, exprimiert werden. Das Besondere an MVA ist, dass der Zusammenbau der Virionen in vielen Säugerzellen gehemmt ist, wodurch unreife Virionen entstehen, welche nicht die Zelle verlassen (Volz und Sutter 2017).

### **1.5.1.5 Eigenschaften von MVA-Impfvektoren**

Auf Vakziniaviren basierte Impfvektoren sind die am häufigsten verwendeten Impfvektoren. Dies liegt vor allem daran, dass sie eine starke Immunantwort hervorrufen können, welche vor allem zytotoxische T-Zellen mit einbindet. Weitere Merkmale sind die großen heterologe DNA-Abschnitte, die sie aufgrund ihrer Größe verpacken können. Zusätzlich sind sie sehr effizient und einfach in der Herstellung. Die Expression der Fremd-DNA erfolgt unter virusspezifischer Kontrolle (Ura et al. 2014). Dies ist wichtig, da MVA seine eigene virale Transkriptionsmaschinerie mit sich bringt und daher seine eigenen Promotorsequenzen erkennt (Broyles 2003). Durch die Verwendung von sogenannten starken Promotoren kann die rekombinante Antigen-Expression erhöht werden und somit auch die Antigen-spezifische Immunantwort verbessert werden (García-Arriaza und Esteban 2014).

Als einer der ersten Versuche um MVA als Impfvektor zu verwenden, wurde die Sequenz des Hämagglutinins A des Influenzavirus durch homologe Rekombination an der Deletion III eingefügt. Auch heutzutage wird die Deletion III für das Einfügen fremder Gensequenzen genutzt, da sich die Deletion innerhalb einer konservierten Region befindet und die Sequenzveränderungen innerhalb dieser Region unwahrscheinlicher sind. Die Deletionen II und IV sowie der Genlokus von Hämagglutinin und der Thymidinkinase können auch als Einfügstelle untersucht und verwendet werden (Volz und Sutter 2017).

MVA kann durch seine Größe und die oben erwähnten Möglichkeiten vielfältig als Impfvektor gegen virale Erkrankungen eingesetzt werden. Dennoch zeigte sich in Phase I von klinischen Impfstudien, dass die Effizienz von MVA erhöht werden sollte (Meyer et al. 2005). Dies könnte an antiviralen Schutzmechanismen innerhalb der Wirtszelle liegen.

#### **1.5.1.6 Hemmung der Pockenvirus und MVA-Replikation in humanen dendritischen Zellen**

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells* APC), die als einzige Zellen naive T-Zellen stimulieren und aktivieren können. Pockenviren wie *Western Reserve* können ihre DNA in myeloiden Zellen nur eingeschränkt replizieren. In diesen sich nicht-teilenden Zellen ist der dNTP-Pool zu niedrig (Hollenbaugh et al. 2013). Dies liegt an dem antiviralen Wirtszellfaktor SAM Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*-SAMHD1). SAMHD1 reduziert die zelluläre dNTP-Konzentration, indem es als Phosphohydrolase, die Deoxyribonukleotide-Triphosphate (deoxynucleotide triphosphate-dNTP) zu anorganischen Phosphat und 2 Deoxynukleoside umwandelt (Goldstone et al. 2011). Pockenviren kodieren für Enzyme wie die Ribonukleotid-Reduktase (RNR) und die Thymidinkinase (TK), die dNTPs für die virale DNA-Polymerase zur Verfügung stellen und somit die DNA-Replikation verstärken. Aus diesem Grund war die *Western Reserve*-Replikation in humanen dendritischen Zellen mit einem deletierten TK-Gen durch SAMHD1 noch stärker eingeschränkt (Hollenbaugh et al. 2013). Mithilfe von Vpx, dass durch Virus-ähnliche Partikel (*Virus like Particles*-VLP) vor einer Infektion mit dem Pockenvirus *Western Reserve* zu sich nicht teilenden myeloiden Zellen gegeben wurde, konnte die virale Replikation von *Western Reserve* erhöht werden (Hollenbaugh et al. 2013). Vpx ist ein Protein vom Humanen Immundefizienz Virus (*Human immunodeficiency virus 2* (HIV-2) und Affen Immundefizienz Virus (*simian immunodeficiency virus*-SIV) kodiertes Protein, das bekannt dafür ist, SAMHD1 dem proteosomalen Abbau zuzuführen (Laguette et al. 2011).

## 1.6 SAMHD1- ein Protein mit antiviralem Wirkmechanismus

SAMHD1 wurde als Restriktionsfaktor für HIV-1 in sich nicht-teilenden Zellen wie primären Monozyten, aus Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (*monocyte-derived macrophages*-MDM), nicht-aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und dendritischen Zellen im Jahr 2011 entdeckt (Laguet et al., 2011; Hrecka et al., 2011; Berger et al., 2011). SAMHD1 ist ein viraler Wirts-Restriktionsfaktor, der mit seiner Phosphohydrolase-Domäne agiert und die Deoxynukleosid-Triphosphat-Konzentration (*deoxynucleotide-triphosphate*-dNTP) in der Zelle reduziert. Dabei sorgt SAMHD1 durch die Hydrolysierung der Deoxynukleotide dafür, dass die HIV-1 reverse Transkription gehemmt und die virale Replikation verhindert wird (Lahouassa et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass auch die DNA-Replikation von Pockenviren durch SAMHD1 beeinträchtigt ist (Hollenbaugh et al. 2013).

SAMHD1 besteht aus zwei strukturellen Domänen: der sterilen  $\alpha$ -Motiv-Domäne (SAM) und einer dNTP-Triphosphohydrolase-Domäne, welche eine Metall-abhängige Phosphohydrolase mit einem konservierten Histidin-Aspartat (HD)-Motiv ist. Beide Domänen sind durch eine kurze Linkerregion verbunden und werden von unstrukturierten Regionen flankiert. Der N-Terminus an der SAM-Domäne besitzt noch ein Kernlokalisierungssignal, während die HD-Domäne für das Herunterregulieren des dNTP-Pools zuständig ist (Goldstone et al. 2011).

Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass SAMHD1 auch eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität gegen einzelsträngige DNA oder RNA besitzt und virale genomische DNA oder RNA abbauen könnte (Ryoo et al. 2014; Ryoo et al. 2016); diese Funktion wird jedoch kontrovers diskutiert (Seamon et al., 2015; Antonucci et al., 2016). SAMHD1 kann dabei einzelsträngige Nukleinsäuren binden (Beloglazova et al. 2013; Goncalves et al. 2012; Seamon et al. 2015).

Mutationen im SAMHD1 wurde auch mit der Autoimmunkrankheit Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) in Verbindung gebracht. Dendritische Zellen aus AGS-Patienten sind zugänglicher für eine HIV-1-Infektion als dendritische Zellen von gesunden Menschen (Berger et al. 2011; Bakir 2018).

Eine Herabregulierung von SAMHD1 in der Zelle sorgt für eine Ansammlung von DNA-Fragmenten, die durch das Stocken der DNA-Replikation (ohne SAMHD1) in der S-Phase des Zellzyklus entstehen (Coquel et al. 2019). Dadurch kommt es in der Zelle zur Erkennung der zytoplasmatischen DNA-Fragmente durch die DNA-Synthase GMP-AMP (cGAS) und dem Stimulator der Interferon-Antwort (*stimulator of interferon response*- STING). Das Auslösen

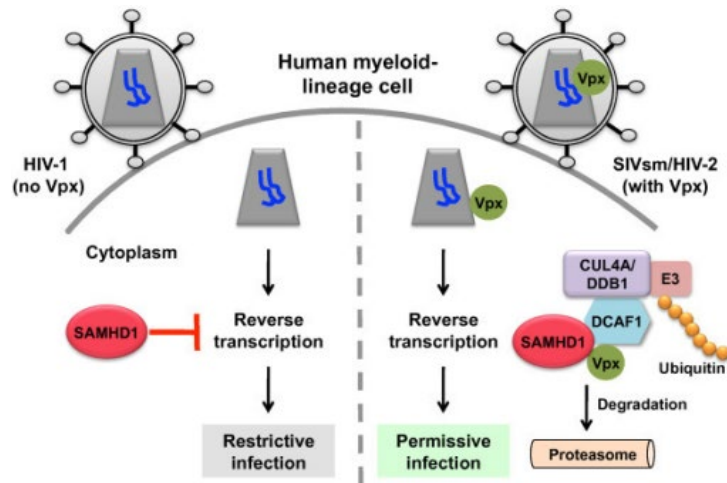
dieses Signalwegs führt unter anderem zur Interferon-Produktion, die eine antivirale Immunantwort auslöst (Coquel et al. 2019).

## **1.7 Vpx ermöglicht die virale Replikation in sich nicht teilenden Zellen**

Vpx ist ein Virion-assoziiertes akzessorisches Protein. Es handelt es sich um ein Protein, welches von HIV-2 und in den meisten SIVs exprimiert wird, allerdings nicht von HIV-1. Vpx wird über die p6-Region des Gag-Proteins von HIV-2 durch spezifische Interaktion verpackt. Es ist wichtig für die effiziente virale Replikation in Makrophagen und dendritischen Zellen (Goujon et al. 2007).

Während sich HIV-1 aufgrund von SAMHD1 nicht in myeloiden Zellen vermehren kann, sorgt das im HIV-2-Genom kodierte Protein Vpx für dessen Vermehrung in myeloiden Zellen. Dabei wird SAMHD1 durch Vpx einer E3-Ligase zugeführt und es kommt zum proteasomalen Abbau von SAMHD1. Vpx bindet dabei DCAF1-DDB1- und CUL4-assoziiierter Faktor 1, welcher ein Substrat-Rezeptor von der CLR4 (Cullin4 RING) Ubiquitin E3 Ligase ist (Laguette et al. 2011) (Abbildung 16).

Trotz der Vermehrung in myeloiden Zellen führt eine HIV-2-Infektion nicht zur Auslösung einer angeborenen Immunantwort. Dies könnte daran liegen, dass Vpx mit Faktoren der Immunantwort wie dem Kernfaktor  $\kappa B$  (*nuclear-factor*  $\kappa B$ -NF- $\kappa B$ ) interagiert (Su et al. 2019).



**Abbildung 16: HIV-1 und HIV-2 Infektion von humanen myeloiden Zellen**

Dargestellt ist der Unterschied in der Infektion der beiden Viren HIV-1 und HIV-2. Während HIV-2 und SIV das virale Protein Vpx exprimieren, welches SAMHD1 dem proteosomalen Abbau zuführt, exprimiert HIV-1 dieses Protein nicht. Durch Vpx wird SAMHD1 dem E3 Ubiquitin-Ligase Komplex zugeführt. In diesem Komplex interagiert Vpx mit der DCAF1-Untereinheit der CUL4A/DDB1 Ubiquitin Ligase, um SAMHD1 über das Proteasom abzubauen (nach (St Gelais und Li Wu 2011)).



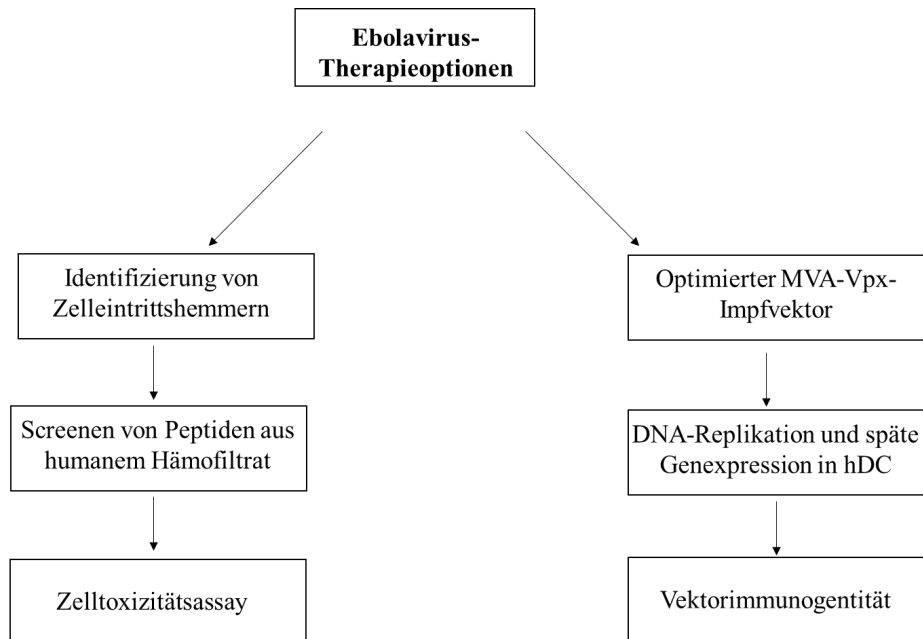
## 1.8 Zielsetzung

Die heutige schnelle und starke Ausbreitung von Viren, benötigt auch schnelle und starke antivirale Therapien. Vor allem bei Erkrankungen an Viren wie durch das Ebolavirus, welches sehr ansteckend und ohne Behandlung oft tödlich endet, ist es wichtig Möglichkeiten zu haben, diese Viren zu untersuchen und somit antivirale Konzepte zu entwickeln.

Eine Möglichkeit das Ebolavirus zu untersuchen und mögliche Inhibitoren zu finden, ist das Pseudotypisieren von lentiviralen Vektoren, welche das Ebolavirus-Glykoprotein (EBOV-GP) tragen und somit seinen Wirtszelltropismus erlangen. Die pseudotypisierten Vektorpartikel können in einem hohen Maß produziert werden und erlauben Arbeiten unter einer niedrigeren Biologischen Schutzstufe (Reduktion von BSL4 auf BSL2). In dieser Arbeit sollten Zelleintrittshemmer identifiziert werden, die aus Peptiden, gewonnen aus menschlichen Hämofiltrat, bestehen.

Als vorbeugende Maßnahme gegen virale Infektion werden Impfungen empfohlen. Gegen das Ebolavirus wurde neben *Everbo* auch ein *prime/boost* Impfstoff zugelassen, der MVA als *boost* (Verstärker)-Impfvektor enthält. MVA allein zeigt in klinischen Studien teilweise limitierte Effizienz, weshalb es oftmals nur als Verstärker eingesetzt wird. Die limitierte Effizienz könnte daran liegen, dass die MVA-Replikation in dendritischen Zellen, den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, welche als einzige naive T-Zellen aktivieren können, unterbrochen ist. MVA kann seine DNA nicht in humanen dendritischen Zellen replizieren und es kommt nicht zur späten Genexpression. Da die heterologen Antigene, die MVA in die Zelle einschleust und gegen die eine Immunantwort ausgelöst wird aber unter starke späte MVA-Promotoren gebracht wird, muss die DNA-Replikation und somit späte Genexpression gewährleistet sein. Die DNA-Replikation wird wahrscheinlich aufgrund von dem antiviralen Wirtszellprotein SAMHD1 geblockt, indem der dNTP-Pool in der Zelle herunterreguliert wird. Um dies zu umgehen und MVA zu befähigen in humanen dendritischen Zellen zu replizieren, wurde ein rekombinantes MVA-Virus hergestellt, welches Vpx, ein virales Protein von HIV-2 und SIV Protein, ko-exprimiert. Es wurden zwei rekombinante MVA-Vpx hergestellt (in Vorarbeiten), wobei eines unter die Expression von einem frühen und späten Promotor gebracht wurde (MVA-Vpx E/L) und das andere MVA-Vpx Vektor unter einen sehr frühen Promotor (MVA-Vpx IE). Mithilfe der rekombinanten MVA-Vpx-Vektoren sollte die späte Genexpression in dendritischen Zellen hergestellt werden und somit die Expression vom Fremdgenen

(Antigenen) verstärkt werden. Dadurch könnte sich die MVA-Immunogenität und Effizienz der Immunantwort erhöhen. Diese Vektoren sollten in dieser Arbeit charakterisiert werden.



**Abbildung 17: Fließdiagramm der beiden hier verwendeten Optionen zur Ebolavirus-Therapie**

Links: Identifizierung von im menschlichen Körper vorkommenden Ebolavirus-Zelleintrittshemmern mithilfe eines EBOV-GP-basierten Neutralisationsassays.

Rechts: Optimierung eines MVA-basierten Impfvektors zur Verstärkung der Immunogenität.

## 2 MATERIAL

---

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Säugerzelllinien und primäre Zellen

BEZEICHNUNG	MERKMALE	REFRENZ
HEK293T	Humane embryonische Nierenzellen, welche stabil mit pcDNA3.1 transfiziert wurden	ATCC-CRL-11268
HEK293luci	Humane embryonische Nierenzellen, welche stabil mit einem lentiviralen Vektor, der das Luziferasegen kodiert, transduziert wurden	NG3 (Paul-Ehrlich Institut)
CD14 <sup>+</sup>	Humane primäre periphere Blut- CD14 <sup>+</sup> Monozyten	Isloiert aus Buffy Coats (Blutspendedienst Universitätsklinikum Frankfurt)

---

### 2.1.2 Medien und Zusätze für Zellkultur

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom GmbH (Berlin)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest (Nuaillé, Frankreich)
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	PeptoTech (Hamburg)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanolsulfonsäure (HEPES)	Biochrom GmbH (Berlin)
Interleukin 4 (IL-4)	PeptoTech (Hamburg)
L-Glutamin (200mM)	Lonza AG (Köln)
PBS-Puffer	Medienküche (Paul-Ehrlich-Institut)
Penicillin/Streptomycin (PS/ 100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
RPMI 1640	Biochrom GmbH (Berlin)
Trypsin-EDTA	Medienküche (Paul-Ehrlich-Institut)

---

## 2.2 Viren

BEZEICHNUNG	TITER	REFERENZ
VACV Western-Reserve (WR)	$1 \times 10^8$	G.Smith, Y. Sang Chan, S. Howard
MVA II new	$6,0 \times 10^6$	A. Mayr, V. Hochstein-Mintzel, H. Stickl
MVA-Vpx E/L	$1,25 \times 10^7$	PEI Arbeitsgruppe 2/2
MVA-Vpx IE	$1,1 \times 10^7$	PEI Arbeitsgruppe 2/2

## 2.3 Plasmide

BEZEICHNUNG	MERKMALE	REFERENZ
pMDLg/pRRE	Ampicillin; HIV-1 gag-pol; rev responsive element	(Dull et al. 1998a)
pRSVrev	Ampicillin; HIV-1 rev	(Dull et al. 1998a)
pCSII-EF-luciferase	Ampicillin; firefly luciferase; HIV Verpackungssignal $\Psi$	(Agarwal et al. 2006)
pHITG	Ampicillin; VSV-G	(Soneoka et al. 1995)
pCMVneo-EBO(z)gp	Ampicillin; EBOV GP (Zaire Strang) mit hinzugefügten ORF	Christine Goffinet (Twincore, Hannover)

## 2.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die fluoreszenzzytometrische Messung verwendet

### 2.4.1 Fluoreszenz-Antikörper

BEZEICHNUNG	KATALOG-NR.	HERSTELLER
PE-Kaninchen-Anti-Human Caspase-3, active; clone C92-605	550821	BD Pharmingen™, Heidelberg
PerCP-Maus-Anti-Human CD3; clone SK7	347344	BD Pharmingen™, Heidelberg
APC-H7-Maus-Anti-Human CD8; clone SK1	560273	BD Pharmingen™, Heidelberg
PE-Cy7-Maus-Anti Human CD69; clone FN50	561928	BD Pharmingen™, Heidelberg
PE-Maus-Anti-Human CD80; clone L307.4	557227	BD Pharmingen™, Heidelberg
PE-Maus-Anti-Human CD86; clone 2331	560957	BD Pharmingen™, Heidelberg
PE-Maus-Anti-Human CD107a; clone H4A3	560948	BD Pharmingen™, Heidelberg
Brilliant Violet-Maus-Anti-Human CD137; clone 4B4-1	566266	BD Pharmingen™, Heidelberg
PE-Maus-Anti-Human MHC I; G46-2.6	555553	BD Pharmingen™, Heidelberg
APC-Maus-Anti Human MHC I; clone W6/32	17-9983-42	ebioscience (Thermo Fisher)
PE-Maus-Anti Human MHC II; clone G46-6	555812	BD Pharmingen™, Heidelberg

Folgende Antikörper wurden für die Western-Blot-Analysen verwendet

### 2.4.2 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
anti-HIV-2-vpx Maus	NIH AIDS Reagents
anti-SAMHD1 Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
anti-Vakzinia Virus (Lister strain) Kaninchen	Acris (Herford)
anti- $\beta$ -aktin Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

### 2.4.3 Sekundärantikörper

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
anti-Maus-HRP	GE Healthcare (München)
anti-Kaninchen-HRP	Dianova (Hamburg)

## 2.5 Chemikalien und Reagenzien

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
ATPlite™	Perkin Elmer (Rodgau)
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Bovine serum albumin (BSA, 10mg/ml)	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
britelite™ plus	Perkin Elmer (Rodgau)
CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Abteilung 3/3; Paul-Ehrlich-Institut (Langen)
Ethanol (EtOH)	Paul-Ehrlich-Institut (Langen)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Abteilung 3/3; Paul-Ehrlich-Institut (Langen)
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Humane Peptidbibliothek	Pharis Biotec GmbH (Hannover)
Isopropanol	Abteilung 3/3; Paul-Ehrlich-Institut (Langen)
ISOTON® II Diluent	Beckman Coulter (Brea, USA)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
MACS Puffer	Abteilung 3/3; Paul-Ehrlich-Institut (Langen)



---

---

## MATERIAL

---

---

Methanol	Abteilung 3/3; Paul-Ehrlich-Institut (Langen)
Paraformaldehyde (PFA)	Merck (Darmstadt)
Roti®-Block	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Trypsin	Abteilung 3/3; Paul-Ehrlich-Institut (Langen)
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

---

## 2.6 Kits

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Dneasy Blood & Tissue Kit	Quiagen (Hilden)
Humanes IL-6 ELISA Kit	PeproTech (Hamburg)
Humanes Interferon $\alpha$ -ELISA Kit	Mabtech Biozol (Eching)
Humanes Interferon $\beta$ -ELISA Kit	PBL assay science, Acris, (Herford)
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim)
Pierce™ BCA Protein-Assay Kit	Fisher Scientific GmbH (Schwert)
Humanes TNF $\alpha$ ELISA Kit	PeproTech (Hamburg)

---

## 2.7 Oligonukleotide

BEZEICHNUNG	ZWECK	SEQUENZ 5'-3'	HERSTELLER
rpo OVP F1	forward Primer für qPCR zur Bestimmung der Menge an synthetisierter viraler DNA	CTGTAGTTATAAA CGTTCCGTGTG	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin)
rpo OVP R1	reverse Primer für qPCR zur Bestimmung der Menge an synthetisierter viraler DNA	TTATCATACGCAT TACCATTTCGA	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin)
rpo OVP TM1	TaqMan-Sonde für qPCR zur Bestimmung der Menge an synthetisierter viraler DNA	6FAM- ATCGCTAAATGAT ACAGTACCCGAAT CTCTACT-BBQ	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin)

---

## 2.8 Geräte

GERÄT	TYP	HERSTELLER
Autoklav	Varioklav	H+P (Oberschleissheim)
Cell counter	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter (Brea, USA)
Chemilumineszenz-Detektor	Fusion FX-7	Vilber (Eberhardzell)
Concentrator	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
DNA-Konzentrations-Messgerät	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher (Schwerte)
Eismaschine	AF80	Scotsman (Vernon Hills, USA)
ELISA Reader	Tecan GENios	MTX Lab Systems, INC. (Vienna, VA, USA)
FACS	BD LSR II SORP	BD (Heidelberg)
Inkubator (Zellkultur)	BBD 6220	Hereaus Sorvall (Hanau)
Kapillare für LightCycler	Polycarbonate Capillaries	Genaxxon bioscience (Ulm)
Lumineszenzsignalmessgerät	PHERASTAR	BMG LABTECH (Ortenberg)
Kühlschrank	4°C/-20°C	Liebherr (Biberach)
Mikroskop	Axiovert 25 Apotome.2	Carl Zeiss AG (Göttingen) Carl Zeiss AG (Göttingen)
MACS Zellaufreinigung	MidiMACS Separator MACS MultiStand	Milteny Biotech (Bergisch Gladbach)
Matrix-Pipette für 384-Well-Platten	E1-ClipTip™ Equalizer	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Netzteil SDS-PAGE und WB	Power-Pac 3000	BioRad (München)
Pipet Boy	pipetus®	Integra Biosciences (Fernwald)
qPCR	LightCycler 1.0	Roche (Mannheim)

## MATERIAL

Schüttler			Unimax 1010		Heidolph (Schwambach)	Instruments
SDS-PAGE Kammer			Mini PROTEAN 3/tetra system		BioRad (München)	
Semi-dry Western Apparatur		Blot	Trans-Blot SD semi-dry transfer cell		BioRad (München)	
Sicherheitswerkbank			Sterilgard III Advanced		The Baker Company (Sanford, USA)	
Thermocycler			Lightcycler 1.2		Roche (Mannheim)	
Tiefkühler			-80°C		Heraeus Sorvall (Hanau)	
Thermomixer			Compact or comfort		Eppendorf (Hamburg)	
Vakuumpumpe			Diaphragm vacuum pump		Vacuubrand GmbH (Wertheim)	
Vortexer			Vibrofix VF1 electronic		IKA (Staufen)	
Waagen			LA1200S TE214S-OCE		Sartorius (Göttingen) Sartorius (Göttingen)	
Wasserbad			System 1068		GFL (Burgwedel)	
Zellaussäer Platten	für	384-Well	MultiFlo Dispenser	Microplate	BioTek (Bad Friedrichshall)	
Zellzähler			Z1 Coulter Counter	Particle	Beckman Coulter (Brea, USA)	
Zentrifugen			RC 26 Plus (Rotor SLA- 1500)		Heraeus Sorvall (Hanau)	
			Eppendorf 5810R (Rotor A-4-62)		Eppendorf (Hamburg)	
			Biofuge fresco (Rotor 3325B)		Heraeus Sorvall (Hanau)	
			Eppendorf 5415C (Rotor F-45-18-11)		Eppendorf (Hamburg)	
			Megafuge 1.0 R		Heraeus Sorvall (Hanau)	
			Eppendorf Concentrator 5301		Eppendorf (Hamburg)	

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

VERBRAUCHSMATERIALIEN	TYP	HERSTELLER
384 Well-Lumineszenz-Platten	CELLSTAR 384-well Mikrotiter-Platte	Greiner (Frickenhausen) Bio-One
FACS-Tubes	5ml	BD (Heidelberg)
Falcon Tube	15 ml, 50 ml	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Handschuhe	Latex	Ansell GmbH (Munich)
Falcon-Tube mit Fritte	Leucosep	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Cryovials	1,8 ml	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
MACS Column	LS Column	Milteny Biotech (Bergisch Gladbach)
Matrix-Pipettenspitzen	ClipTip™ pipette tips	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Mikroplatten	CELLSTAR® 96W Microplate	SIGMA-Aldrich (Taufkirchen)
Oberflächendesinfektion	Terralin	Schülke & Mayr (Norderstedt)
Objektträger	Superfrost Ultra Plus	Menzel (Braunschweig)
Pipettenspitzen	1000 µl, 200 µl, 10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (gestopft)	1250µl, 300 µl, 100 µl, 10 µl	Biotix, VWR (Darmstadt)
Plastikpipetten	25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF)	Immobilon®-P	Millipore (Bedford, USA)
Reaktionsgefäße	1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Whatman paper	-	Hartenstein (Würzburg)

## MATERIAL

Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturplatten	6-Wells	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Zellschaber 39 cm	VWR (Darmstadt)
Zellkulturschalen	10 cm	Sarstedt (Nümbrecht)

## 2.10 Software

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Analyse der qPCR	LightCycler Software 2.0
Western Blot Analyse	Fusion FX-7
Durchflusszytometrie-Auswertung	BD FACSDiva™ Software Version 6.1.3; FCS Express V7.0
Graphische Auswertung	Graph Pad PRISM (Software Version 9)

## 3 METHODEN

---

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolation von zellulärer DNA

Für die Isolierung von zellulärer DNA wurde das „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) verwendet. Dabei wird die gesamte zelluläre (zytoplasmatische und nukleäre DNA) aufgereinigt. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

#### 3.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Für jede Messung wurden 1,5 µl DNA-Lösung verwendet.

#### 3.1.3 Quantitative PCR (qPCR)

Für die Quantifizierung der Vakzinia-Replikation wurde die quantitative PCR mit einer Taq-Man-Probe verwendet. Dabei wurde die *rpo18*-DNA mithilfe von zwei Primern amplifiziert, die das zu amplifizierende Gen flankieren. *rpo18* wurde hierfür als Gen verwendet, da dies ein zwischen den verschiedenen Pockenvirus-Stämmen hochkonserviertes Gen ist. Die Quantifizierung erfolgte dabei mithilfe einer Kalibrierungsgeraden, die durch verschiedene Verdünnungsstufen ausgehend von  $10^8$  Kopien des *rpo18* Gens erstellt wurde. Die PCR-Analyse wurde mit dem Lightcycler 1.2 (Roche, Mannheim) durchgeführt.



## 3.2 Zellkultur-Techniken

Alle Arbeiten erfolgten immer unter sterilen Bedingungen. Hierfür wurde einer Produktschutzsicherheitswerkbank verwendet.

### 3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Säugetierzellen, die im Stickstofftank eingefroren waren, wurden zunächst kur bei -80°C gelagert und anschließend kurz im Wasserbad aufgetaut. Daraufhin wurden sie in 10 ml frisches vorgewärmtes *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM) gegeben. Das DMEM wurde vorher mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt. Für die Entfernung von DMSO-Resten wurde nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 1500 rpm) der Überstand verworfen und die Zellen in einem geeigneten Volumen DMEM aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf geeigneten Zellkulturflaschen ausplattiert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre in einem Inkubator gelagert. Das Kultivierungsmedium wurde mehrmals gewechselt. Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle 3 Tage 1:10 passagiert. Dafür wurde das Kultivierungsmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung erfolgte die proteolytische Spaltung der extrazellulären Adhäsionsproteine der Zellen, wodurch die Zellen von der Plastikoberfläche der Flasche abgelöst werden konnten. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen frischem DMEM aufgenommen und auf die Zellkulturflaschen ausgebracht. Vor einem Experiment wurde die genaue Zellzahl bestimmt.

### 3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen entweder abgeschabt oder mittels der Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche gelöst und in neues Medium aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen 1:100 in 9,9 ml ISOTON II Diluent (Beckman Coulter) gelöst und die Zellzahl pro ml wurde im Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter) nach Herstellerprotokoll gemessen.

### 3.2.3 Lagerung von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst (siehe 3.2.1) und anschließend zentrifugiert (3 min, 1500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml FCS, welches vorher mit 1 % DMSO versetzt worden ist, resuspendiert. Anschließend erfolgte die Verteilung auf *Cryo Pure Tubes* (Sarstedt) und die Lagerung bei -80 °C. Nach 24 h wurden die Zellen in den *Cryo Pure Tubes* in Flüssigstickstoff überführt.

### 3.2.4 Herstellung von Zelllysaten

Zellen wurden von den Zellkulturplatten durch einen Zellschaber oder durch Trypsin/EDTA-Behandlung gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (3 min, 300 g). Nach der ersten Zentrifugation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und noch einmal zentrifugiert (3 min, 300 g). Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer resuspendiert (abhängig vom Zellkulturgefäß wurden z.B. für ein Well einer 12-Well Platte 100 µl, für ein Well einer 6-Well-Platte 250 µl und für eine 10 cm Schale 900 µl Lysepuffer verwendet). Es erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 15 min. Anschließend wurden die Zellen noch einmal zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Je nach Volumen wurde eine entsprechende Menge an 4x SDS-Probenpuffer (plus β-Mercaptoethanol) hinzugegeben und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Die Proben wurden entweder sofort mittels Natrium Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophorese*-SDS-PAGE) analysiert oder für weitere Verwendungen bei -20 °C weggefroren.

#### SDS-Lysepuffer

1% Nonidet P-40
50mM TRIS-HCl pH 7.5
5mM EGTA,
150mM NaCl,
40 µl/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

### 3.2.5 Ebolavirus-Neutralisationsassay im 384-Well Format

Für den Ebolavirus-Neutralisationsassay wurden 6000 HEK293T-Zellen/ 20 µl Medium (DMEM +1 % FCS, + 2 mM Glutamin, +1 % Streptomycin/Penicillin) mithilfe eines MultiFlo Microplate Dispensers (BioTek) auf eine nicht-transparente 384-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die für den Neutralisationsassay verwendeten pseudotypisierten Ebolavirus-Vektorpartikel (EBOV-GP-VP) und VSV-Vektorpartikel (VSV-G-VP) wurden vor jedem Experiment getestet und mit einem konstanten Lumineszenz-Signal von 50000 Lichteinheiten (LU) eingestellt. Die Inhibitoren, hier Peptidfraktionen, wurden mit den Vektorpartikeln (VP) auf eine 96-Well (35 µl der Peptidfraktion + 35 µl der Vektorpartikel) gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Übertragung von 60 µl des Vektorpartikel-Peptid-Mix auf die Zellen in der 384-Well-Platte. Jeweils 20 µl des Mixes wurden pro Well auf die Zellen gegeben, sodass jeder Ansatz in Triplikaten gemessen werden konnte. Nach 16 h wurden 20 µl *Britelite* (PerKin Elmer) Substrat hinzugegeben und nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Messung des Lumineszenz-Signals mithilfe des PHERAstars (BMG Labtech). Das Lumineszenz-Signal kann nur durch die Umwandlung des hinzugefügten Substrates durch die Luziferase entstehen. Ein Signal deutet auf die erfolgreiche Transduktion der Zellen durch die Vektorpartikel und die Expression des Luziferase-Reportergens hin. Vektorpartikel, die nur in Medium gelöst wurden, dienten hierbei als Kontrolle. Das Ergebnis wurde als relative Licht-Einheiten (*relative light units*, RLU) als Prozent in Bezug auf die unbehandelte Kontrolltransduktion dargestellt.

### 3.2.6 NF-κB-Luziferase-Reportergen-Assay

Für die Untersuchung des Anschaltens des NF-κB-Signaltransduktionswegs wurde eine rekombinante NF-κB reporter (luc)-HEK293 Zelllinie verwendet. Sie enthält ein Luziferase-Reportergen, welches unter einem Promotor mit 4 Kopien eines NF-κB-responsiven Elements exprimiert wird. Löst eine Infektion die Phosphorylierung von IκkB aus, wird NF-κB freigesetzt und kann in den Zellkern translokalisieren. Dort bindet es an das NF-κB-responsive Element des Promotors und löst die Expression des Luziferase-Gens aus.

Am Vortag wurden 6000 NF-κB Reporter (luc)-HEK293-Zellen/ Well in einer 384-Well-Platte gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst eine 4h Inkubation mit TNF α und anschließend wurden die NF-κB Reporter (luc)-HEK293-Zellen mit den verschiedenen Pockenviren und verschiedenen MOI (0,1; 1; 5) für weitere 4h inkubiert. Daraufhin wurden die infizierten NF-κB Reporter (luc)-HEK293-Zellen mit dem Substrat

*britelite* (PerKin Elmer) inkubiert und am PHERASTAR (BMG Labtech) das Lumineszenz-Signal gemessen.

### **3.2.7 Generierung von humanen dendritischen Zellen**

Humane periphere von Blut abgeleitete Monozyten wurden aus Buffy Coats von gesunden Spendern durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dabei wurden CD14<sup>+</sup>-Zellen durch positive Selektion mittels des CD14 MicroBeads Kit (Miltenyi, und des MACS-Systems (Miltenyi) isoliert. Isolierte Monozyten wurden mittels des Zellzählers Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter) gezählt (3.2.2) und in einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  auf jeweils einem Well einer 6-Well-Platte (Sarstedt) ausgesät. Die Differenzierung zu humanen dendritischen Zellen erfolgte durch eine 6-tägige Inkubation der Zellen in RPMI-Medium, welches 10 % FCS, 100 U Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM glutamine, 1 % 1 M HEPES-Puffer, 0.2 % 25 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 enthielt.

#### **3.2.7.1 Infektion von humanen dendritischen Zellen mit Pockenviren**

Am Vortag der Infektion wurden die ausdifferenzierten humanen dendritischen Zellen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  pro Well ausgesät. Für die Infektion wurde eine entsprechende Menge an Virus, ausgedrückt in Multizität der Infektion (*Multicity of Infection* = MOI) z.B. MOI 1, MOI 3 oder MOI 5 in einem geeigneten Volumen Medium (RPMI + 2 % FCS) gemischt und auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Entfernung von Viren, die die Zellen nicht in der Inkubationszeit infiziert haben, wurden die Zellen mit dem Infektionsmedium aus den Wells entnommen und herunterzentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in frischem Vollmedium (RPMI mit 10 % FCS) resuspendiert. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen 8 - 24 h weiterkultiviert.

#### **3.2.7.2 Ernte von infizierten Zellen**

Für die Untersuchung der Auswirkung verschiedener Pockenviren wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.2.7.1 beschrieben, infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Dafür wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastikspatels vom Boden der Zellkulturschale abgelöst, in ein geeignetes Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt und zentrifugiert (1000 g, 3 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit einem geeigneten Volumen sterilen PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1000 g, 3 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen von 300-500  $\mu$ l PBS + 2 % FCS resuspendiert.

### **3.2.7.3 Durchflusszytometrie**

#### **Messung der Expression von Oberflächenmarkern**

Für die Messung der Oberflächenmarker nach Infektion wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Dabei wird nach dem Antikörper-Antigen-Bindeprinzip verfahren. Es wird ein Antikörper verwendet, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Der Antikörper bindet an sein Antigen auf der Zelloberfläche und somit wird das Antigen und somit auch die Zelle fluoreszenzmarkiert. Die Zelle wird nun mit einem Laserstrahl angestrahlt. Dabei wird das Fluoreszenzmolekül angeregt. Wenn die Elektronen wieder in ihren Grundzustand übergehen, wird eine bestimmte Menge an Energie bzw. Licht wieder abgegeben, welches im Durchflusszytometer gemessen werden kann.

Es wurden  $1 \times 10^6$  humane dendritische Zellen mithilfe eines Zellschabers oder durch Resuspendieren in ein FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (3 min, 300 g) und anschließend mit FACS-Puffer (PBS + 2 % FCS) zweimal gewaschen. Es wurden ein oder mehrere Detektionsantikörper in FACS-Puffer hinzugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgten nochmals zwei weitere Waschschrte. Die Zellen wurden dann in 100 µl PBS mit 2 % PFA fixiert und bis zur Messung dunkel bei 4 °C gelagert. Es wurden mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen pro Probe gemessen. Ungefärbte Proben dienten als Negativkontrolle.

#### **Messung der Expression von intrazellulären Markern**

Für die intrazelluläre Messung von Caspase-3 mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden, damit anschließend der Antikörper an sein Antigen (in diesem Fall Caspase-3) binden kann. Dafür wurde das Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit (BD Bioscience) verwendet. Enthalten sind dabei Lösungen, die zum einen erlauben, die Zellen zu permeabilisieren und zu waschen und zum anderen als Verdünnungslösung der Antikörper dienen. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

#### **Messung der T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit infizierten humanen dendritischen Zellen**

Humane dendritische Zellen wurden wie in 3.2.7 mit der positiven Selektion von CD14<sup>+</sup>-Zellen isoliert. Die restlichen Zellen, welche nicht anhand von CD14<sup>+</sup>-Beads selektioniert wurden (PBL), wurden mittels Zellzählers Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter) gezählt (3.2.2) und in einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen bei -80 °C weggefroren (3.2.3). Nach der 5-tägigen Inkubation der CD14<sup>+</sup>-Zellen mit 5 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4, wurden die

Zellen mit den verschiedenen Viren (VACV; MVA; MVA-Vpx E/L; MVA-Vpx IE) bei einer MOI 1 für 16h infiziert (3.2.7.1). Anschließend wurden die PBL aufgetaut und mit Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) (5 $\mu$ M) gelabelt. Dafür wurden sie 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und mehrmals vorsichtig gemischt, um eine gute Verteilung des CFSE zu erhalten. Die gelabelten PBL wurden mehrmals mit dem 10 fachen Volumen RPMI mit 2% FCS gewaschen und zu den infizierten humanen dendritischen Zellen für 5 Tage gegeben. Die Zellen wurden geerntet und herunterzentrifugiert (300 g, 5 min) und mit einem anti-CD3-Antikörper für 30 min im Dunkeln zusätzlich gelabelt. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit PBS + 2% FCS gewaschen und wurden dann in 100  $\mu$ l PBS mit 2 % PFA fixiert. Daraufhin wurden sie am BD LSR II SORP (BD Biosciences) gemessen.

#### **Messung von T-Zell-Aktivierungsmarkern nach Inkubation mit infizierten humanen dendritischen Zellen**

Humane dendritische Zellen (3.2.7) und PBLs wurden wie oben (T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit infizierten humanen dendritischen Zellen) generiert. PBLs wurden in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen bei -80 °C weggefroren (3.2.3). Nach 5 Tagen wurden die humanen dendritischen Zellen für 16 h infiziert (3.2.7.1), die PBLs daraufhin dazugegeben und beide Zelltypen 5 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Aktivierungsmarker am BD LSR II SORP (BD Bioscience) (Messung der Expression von Oberflächenmarkern).

#### **3.2.7.4 Interferon $\alpha$ und $\beta$ ELISA**

Humane dendritische Zellen wurden in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  pro Well in 12-Well-Platten am Vortag ausgesät. Anschließend wurden sie mit einer MOI 1 wie in 3.2.7.1 infiziert und 12 h inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und mit dem Interferon  $\alpha$ -Kit von Mabtech (Biozol) und dem Interferon  $\beta$ -Kit von PBL Assay Science (Acris) analysiert.

#### **3.2.7.5 Interleukin 6 und TNF $\alpha$ -ELISA**

Humane dendritische Zellen wurden in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  pro Well in 12-Well-Platten am Vortag ausgesät. Anschließend wurden sie mit einer MOI 1 wie in 3.2.7.1 infiziert und 24 h inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und mit dem IL-6-Kit (PeproTech) und TNF $\alpha$ -Kit (PeproTech,) analysiert.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Bestimmung der Proteinmenge

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll. Die Detektion wurde mit einem Mikroplatten Reader (Tecan) und der Tecan XFluor™ Software durchgeführt.

#### 3.3.2 Natrium Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte nach dem Verfahren von Laemmli (Laemmli 1970). Das von Ullrich Laemmli entwickelte Verfahren erlaubt es Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen Elektrophoresesystem aufzutrennen. Durch die hohe Konzentration an negativ-geladenem Natrium Sulfat Polyacrylamid (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*-SDS), welches sich an die Proteine anlagert, wird die positive Ladung der Proteine kompensiert und die Proteine können begrenzt durch ihre Größe in einem SDS-Gel aufgetrennt werden. Zunächst werden die Proteine in einem Sammelgel konzentriert. Anschließend wandern sie gemeinsam in das höher-prozentige sogenannte Trenngel ein. Die Zusammensetzung der benötigten Gel-Lösungen ist unten aufgeführt. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der Molekulargewichtsstandard *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 40 mA/Gel im SDS-Laufpuffer und zwar solange bis die Bromphenolbande, welche die Lauffront markiert, das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend konnten die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine mittels Immunoblot näher analysiert werden.

<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
-----------------------------	---------------------------------------

<b>Sammelgelpuffer</b>	500 mM Tris-HCl pH6,8
	0,4 % SDS, pH6,8

<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris (pH8,8)
	0,4 % SDS pH8,8



<b>Sammelgel (5%)</b>	0.9 ml Sammelgelpuffer,
	2.2 ml H <sub>2</sub> O
	0.6 ml Rotiphorese® Gel 30
	20 µl APS (10 %)
	5 µl TEMED

<b>Trenngel</b>	2.3 ml Trenngelpuffer
	3.1 ml H <sub>2</sub> O
	3.9 ml Rotiphorese® Gel 30
	95 µl APS (10%)
	5 µl TEMED

### 3.3.3 Immunoblotanalysen

Mit Hilfe der *Western Blot*-Technik und nachfolgender Immunfärbung können die Proteine immunologisch nachgewiesen werden. Dafür werden die vorher in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose- oder eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde das Semi-Dry Transfersystem (BioRad, Feldkirchen) verwendet. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran durch Inkubation mit Methanol und anschließend Tris-Borat-Puffer aktiviert. Der Proteintransfer wurde in *TBS*-Transferpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA pro Membran/Gel für 75 min durchgeführt. Anschließend wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Roti-Block (Carl Roth) abgesättigt.

### 3.3.4 Immunfärbung

Nach dem Blocken für 1 h oder über Nacht wurde die Membran mit der spezifischen Primärantikörper-Lösung für mind. 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 15 min TBS-Tween gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine Inkubation für 1 h mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Danach erfolgten nochmals drei Waschschritte mit TBS-Tween für jeweils 15 min. Für die HRP-vermittelte Leuchtreaktion wurde die Membran mit einem chemolumineszenten Substrat inkubiert. Durch dieses Substrat wird die Chemolumineszenz unter Beteiligung des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) verstärkt und konnte im Fusion X7 (VILBER) analysiert werden.

#### Tris-Borat-Puffer

6g TRIS-Base
3,1 g Borsäure
10 ml 10% SDS
add. 900 ml H <sub>2</sub> O
100 ml Methanol

#### TBS-Tween

TBS : Section 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
Tween 20:Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

### 3.3.5 Strippen der Membran

In dem Fall, dass eine Membran, welche bereits mit einem ersten und zweiten Antikörper inkubiert worden ist, erneut mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden sollte, wurde die Membran 15 min in ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution (Millipore) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit Tris gepufferter Kochsalzlösung mit Tween20 (*Tris-Buffered Saline Buffer with Tween20*-TBS-T) (jeweils 15 min) konnte die Membran wieder wie in 3.3.4 beschrieben, gefärbt werden.

## 4 ERGEBNISSE

---

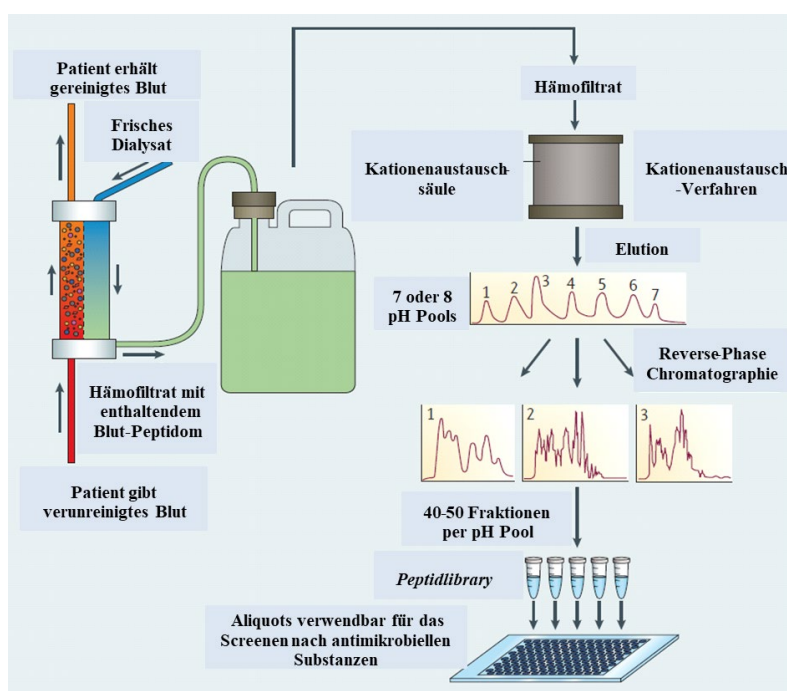
### 4.1 Identifizierung von Inhibitoren des Ebolavirus-Zelleintritts

Der Ebolavirus-Ausbruch von 2014 - 2016 in West-Afrika ließ die rasche Entwicklung für Medikamente oder Impfungen gegen die Ebolavirus-Erkrankung in den Fokus der Forschung rücken.

In diesem Projekt sollten im menschlichen Körper natürlich vorkommende Peptide identifiziert werden, welche fähig sind den Ebolavirus-Zelleintritt zu hemmen. Der Zelleintritt ist der erste Schritt in der Ebolavirusreplikation. Mit der Inhibierung des Zelleintritts soll die rasche Ausbreitung des Virus innerhalb des Körpers somit schon im Anfangsstadium unterdrückt werden. Für die Identifizierung von Ebolavirus-Zelleintrittshemmern wurde eine Peptidbibliothek, welche aus humanem Hämofiltrat (einem Abfallprodukt, welches bei der Dialyse entsteht) gewonnen wurde, durchsucht. Die Durchsuchung der Peptidbibliothek erfolgte mit lentiviralen Vektorpartikeln, die mit dem Ebolavirus-Glykoprotein (EBOV-GP), welches für den Ebolavirus-Zelleintritt zuständig ist, pseudotypisiert wurden. Mithilfe dieser EBOV-GP-Vektorpartikeln war das Arbeiten unter Biologischer Sicherheitsstufe 2 (BSL2) gewährleistet.

### 4.1.1 Herstellung einer humanen Peptidbibliothek aus Hämofiltrat

Es gibt eine Reihe von natürlichen antiviralen Peptiden, die aus menschlichen Körperflüssigkeiten wie Nasensekret (Lysozyme) (Fleming 1992), Schweiß (Dermicidin) (Schittek et al. 2001) oder Speichel (Histatin) (Oudhoff et al. 2008) isoliert worden sind. Menschliche Körperflüssigkeiten sind daher eine potenzielle Quelle für die Identifizierung antiviraler Substanzen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit fraktionierte Peptide auf ihre antivirale Funktion getestet, die aus humanem Hämofiltrat isoliert wurden. Das menschliche Hämofiltrat (HF) stammt aus dem Abfall-Produkt, welches bei einer Dialyse entsteht. Während der Dialyse wird das Blut durch eine Membran mit einem Filter für 20-30 kDa große Proteine gefiltert. Es bleiben Peptide und kleine Proteine zurück. Das Filtrat wird angesäuert und die Peptide über eine Kationenaustauschsäule gebunden und mit Puffern bei verschiedenen pH-Werten (*Pool* 1-8) eluiert. Anschließend erfolgt eine Auftrennung mithilfe einer Umkehrphasen-Chromatographie und die dabei entstandenen 40-50 Fraktionen pro pH-Pool (ca. 300-500 Peptidfraktionen) werden gefriergetrocknet und können somit für verschiedene Untersuchungen verwendet werden (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Verfahren zur Generierung einer Peptidbibliothek aus humanem Hämofiltrat**

Humanes Hämofiltrat, welches durch Filtration bei der Dialyse entsteht, wird in einem standardisierten Verfahren, welches Peptide aus bis zu 10000 Liter Flüssigkeit auftrennen kann, verarbeitet. Bei diesem Verfahren werden die Peptide zunächst verdünnt, angesäuert und anschließend auf eine Kationenaustauschsäule gegeben. Stufenweise werden die gebundenen Peptide durch die Verwendung von Puffern mit aufsteigendem pH-Wert (2,5-9,0) eluiert. Die daraus resultierenden pH-Pool-Fraktionen werden mittels Reverse-Phase-Chromatographie in 40-50 Peptide pro Fraktion aufgetrennt und durch Gefrier Trocknung konzentriert. Die finale Hämofiltrat-Peptidbibliothek mit 300-500 gefriergetrockneten Fraktionen enthält das gesamte Blut-Peptidom in einer hochkonzentrierten, salzfreien und bioaktiven Form (modifiziert nach Münch *et al.*, 2014).

#### **4.1.2 Identifizierung von Inhibitoren des Ebolavirus-Zelleintritts innerhalb einer Hämofiltrat-Peptidbibliothek**

Um Ebolavirus-Zelleintrittshemmer innerhalb der Peptidfraktionen aus dem humanen Hämofiltrat (Abbildung 18) zu identifizieren, wurde ein vorher bereits entwickelter Neutralisationsassay mit pseudotypisierten Ebolavirus-Vektorpartikeln verwendet (Weber et al. 2014; Beck et al. 2016). Die verwendeten Vektorpartikel (VPs) wurden mit Ebolavirus-Glykoprotein (EBOV-GP) pseudotypisiert und trugen ein Luziferase-Gen als Reporter. Folglich wurden sie als EBOV-GP-VP abgekürzt. Die Vektorpartikel-Produktion erfolgte durch transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit vier Plasmiden. Zwei Plasmide kodierten für die Bestandteile der lentiviralen Partikel, die nötig für die Verpackung und Ausführung der reversen Transkription/Integration ins Wirtsgenom (pMDLg/pRRE, pRSVrev) sind, ein Plasmid kodierte für das Luziferase-kodierende Vektorgenom (pCSII-Luc) und ein weiteres für das virale Hüllprotein pEBOV-GP (Ebola-virus-Glykoprotein) oder pHIT-G (VSV-Glykoprotein). Die für diese Arbeit verwendeten viralen Hüllproteine waren das Ebolavirus-Glykoprotein (EBOV-GP) und als Kontrolle das für einen breiten Wirtstropismus bekannte Vesikuläre-Stomatitis-Virus-Glykoprotein (VSV-G). Nur wenn die Vektorpartikel die Zellen transduzieren können, d.h. der Zelleintritt nicht gehemmt wird, kann die Luziferase exprimiert werden und das Substrat umgewandelt und als Lichteinheiten (LE) gemessen werden. Wird die Transduktion allerdings gehemmt, wird auch der Gentransfer der Luziferase gehemmt und das Protein kann nicht exprimiert werden. Dadurch sind keine Lichteinheiten messbar. In dem hier verwendeten Neutralisationsassay wurden HEK293T-Zellen als Zielzellen verwendet, da der in der vorliegenden Arbeit verwendete Neutralisationsassay basierend auf HEK293T-Zellen entwickelt wurde (Weber et al. 2014; Beck et al. 2016) und bekannt ist, dass das Ebolavirus eine Reihe von Zellen in Kultur unter anderem auch HEK293T-Zellen infizieren kann (Wool-Lewis und Bates 1998). Die HEK293T-Zellen wurden zunächst auf 384-Well-Platten ausplattiert. Nach 24h Inkubation wurden die EBOV-GP- und VSV-G-pseudotypisierten Vektorpartikel (VSV-GP-VP) mit den lyophilisierten Peptiden aus humanem Hämofiltrat (HF), welches uns von unserem Kooperationspartner Pharis Biotec GmbH zu Verfügung gestellt wurden, inkubiert und auf die Zellen gegeben. Nach 16 h wurde das Lumineszenz-Signal als Indikator des Zelleintritts detektiert.

Die 384 verschiedenen Peptidfraktionen aus der Hämofiltrat-Peptidlibrary wurden in einem ersten *Screen* getestet (Abbildung 19). Die Peptidfraktionen wurden durch die vorher

beschriebene Auftrennung (Abbildung 18) in 48 verschiedene Peptidfraktionen pro pH-Pool (8 verschiedene pH-Pools) durch unseren Kooperationspartner Pharis Biotech GmbH aufgeteilt (Abbildung 19). Durch die Auftrennung der Peptide in den verschiedenen Fraktionen ist es möglich, dass sich in Fraktionen, die sich nebeneinander befinden, verschieden hohe Konzentrationen eines hemmenden Peptids aufweisen. So befindet sich in den mittleren Fraktionen oftmals das Peptid in hohen Konzentrationen, während es in den „Randfraktionen“ um das Peptid in niedriger Konzentration vorhanden ist. Peptidfraktionen, die nebeneinander vorkamen und nach 16 h das Luziferase-Signal der pseudotypisierten Vektorpartikel im Vergleich zu unbehandelten transduzierten Zellen senken konnten, wurden als positive Fraktionen (*hit*) mit potentiell hemmenden Ebolavirus-Zelleintritts-Peptiden bewertet.

Während bei dem Screen der pH-Pools 1 (Peptidfraktion 27), pH-Pool 2 (Peptidfraktion 33), und pH-Pool 5 (Peptidfraktion 27) nur einzelne Peptide identifiziert werden konnten, die den EBOV-GP-VP-Zelleintritt hemmen. Auch die Peptidfraktionen 15 und 16 sowie die Peptidfraktionen 35, 36 aus dem pH-Pool 4 und die Peptidfraktionen 21 und 22 aus dem pH-Pool 6 scheinen die EBOV-GP-VP-Transduktion zu hemmen (Abbildung 19). Allerdings können sie nicht als *hit* identifiziert werden, da es sich um einzelne oder lediglich zwei nebeneinanderliegende Peptidfraktionen handelt. Hier wird allerdings sowohl das Luziferase-Signal der EBOV-GP-VPs, als auch das der VSV-G-VPs stark reduziert, während in der Peptidfraktion 27 des pH-Pool 5 und der Peptidfraktion 22 des pH-Pool 6 das EBOV-GP-VP-Luziferase-Signal deutlich stärker herabgesetzt wird als jenes von VSV-G-VP (Abbildung 19).

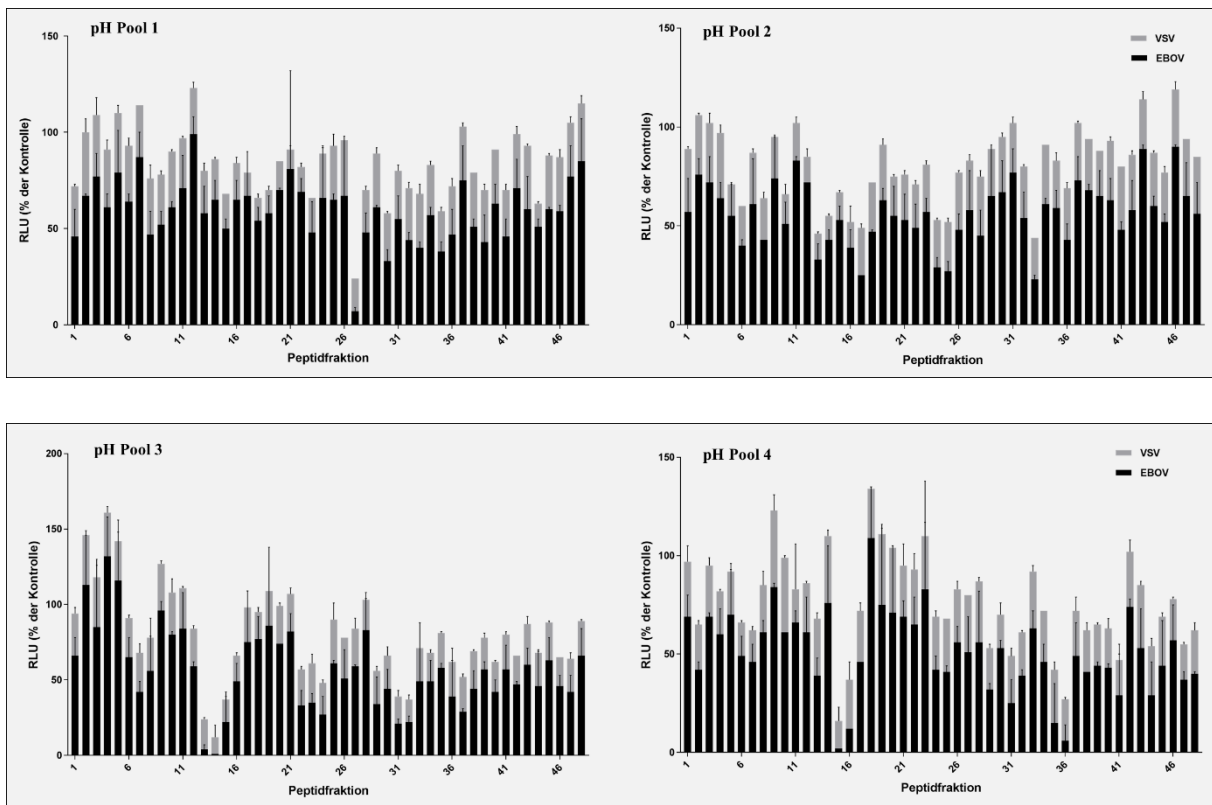
Die Peptidfraktionen 24 - 28 des pH-Pool 7 senken das Luziferase-Signal sowohl der EBOV-GP-VP als auch das der Kontrolle VSV-G-VP und wurden als *hit* betrachtet. Es könnte sich hierbei um ein Peptid handeln, welches durch die Aufreinigungsmethode in den Fraktionen 25 - 27 in hoher Konzentration vorhanden ist und in den „Randfraktionen“ 24 und 28 in etwas niedrigerer Konzentration. Dies wäre ein Grund dafür, dass in den Fraktionen 24 und 28 das Luziferase-Signal dort nicht so stark gehemmt wird, wie es in den Fraktionen 25 - 27 der Fall ist. Allerdings ist auffällig, dass auch das Signal der VSV-G-VP stark herabgesetzt wird.

Mit dem Neutralisationsassay der Peptidfraktionen aus dem pH-Pool 8 konnten weitere Peptidfraktionen wie die Fraktion 24 - 28 mit hemmenden Eigenschaften identifiziert werden. Dabei scheint das Luziferase-Signal der EBOV-GP-VP durch die Peptidfraktionen 24 - 26 sehr stark reduziert zu werden, was für eine hohe Konzentration des hemmenden EBOV-GP-VP-

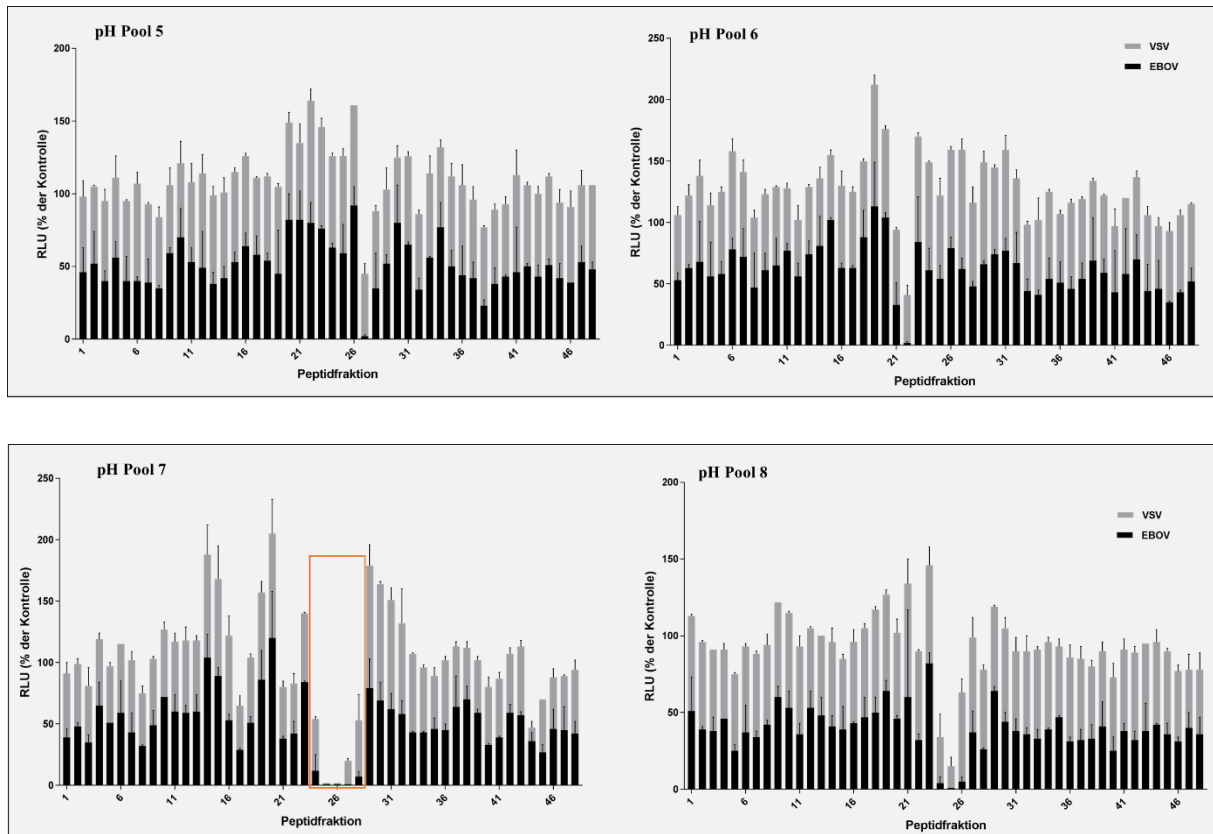
## ERGEBNISSE

Peptids spricht, während es in der „Randfraktion“ 27 und 28 nicht ganz so stark herabgesetzt wird, wofür eine niedrigere Peptidkonzentration verantwortlich sein könnte (Abbildung 19).

Es wurde entschieden mit den hemmenden Peptidfraktionen des pH-Pool 7 weiterzuarbeiten (Abbildung 19) und die Peptidfraktionen in einer zweiten Chromatographierunde weiter aufgetrennt (Abbildung 20), wodurch neue, weiter aufgetrennte Peptidfraktionen (Peptidfraktion 1-36) entstanden, die in einem zweiten Neutralisationsassay getestet wurden (Abbildung 20).



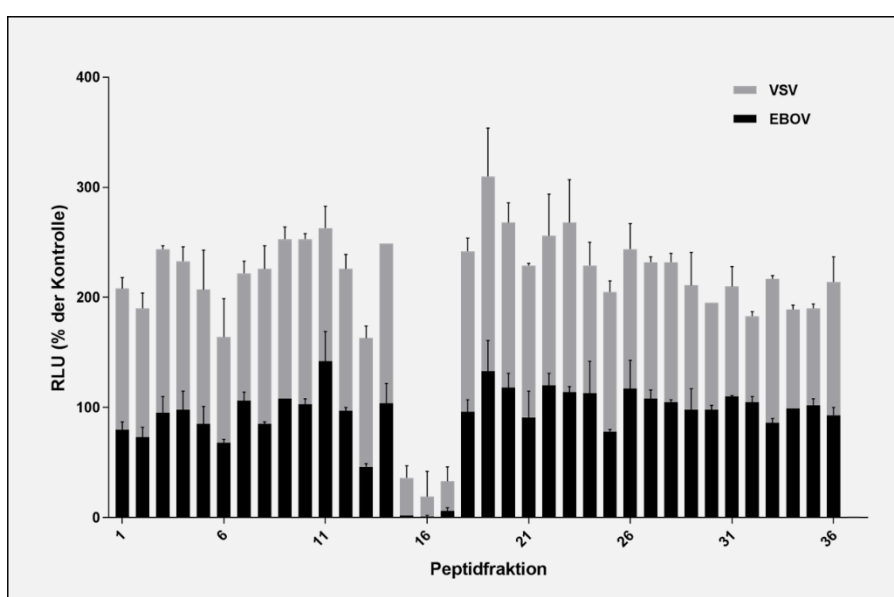




**Abbildung 19: Analyse des inhibierenden Effekts von Hämofiltrat-Peptiden (pH-Pool 1-8) auf EBOV-GP und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikeln**

HF-Peptidfraktionen aus den verschiedenen pH-Poolen (1-8) wurden mit EBOV-GP- und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikeln für 30 min inkubiert und zu HEK293T Zellen gegeben. Die neutralisierende Aktivität wurde nach 16h Inkubation als relative Lichteinheiten (*relative light units*-RLU) detektiert. Die Luziferase-Aktivität wird als Prozentzahl relativ zur DMSO-behandelten Kontrolle gezeigt. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten

Bei der Inkubation der Vektorpartikel mit den Peptidfraktionen 15 - 17 war eine deutliche Herabsetzung des Luziferase-Signals zu erkennen. Allerdings ähnlich wie in den Fraktionen des ersten Peptidscreens (Abbildung 19) wird sowohl das Signal bei Inkubation der EBOV-GP-VP, als auch das der VSV-G-VP mit den Peptiden gesenkt (Abbildung 20). Dies könnte auch auf eine allgemeine Zytotoxizität schließen lassen. Zur weiteren Untersuchung der Peptidfraktionen auf ihre Eigenschaften erfolgte deshalb ein ATP-basiertes Luziferase-Zelltoxizitäts-Assay (Abbildung 21).



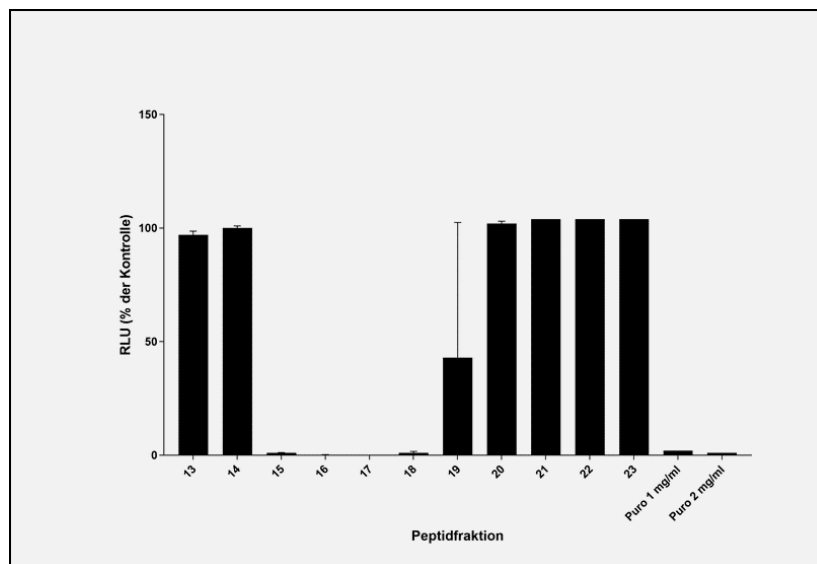
**Abbildung 20: Analyse des inhibierenden Effekts von erneut aufgetrennten Hämofiltrat-Peptiden (pH-Pool 7) auf EBOV-GP und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikeln**

Aus pH-Pool 7 erneut aufgetrennte HF-Peptidfraktionen (Abbildung 19) wurden mit EBOV-GP- und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikeln für 30 min inkubiert und zu HEK293T Zellen gegeben. Die neutralisierende Aktivität wurde nach 16h Inkubation als relative Lichteinheiten (*relative light units*-RLU) detektiert. Die Luziferase-Aktivität wird als Prozentzahl relativ zur DMSO-behandelten Kontrolle gezeigt. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten

### 4.1.3 Zelltoxizitätsassay mit potentiell Ebolavirus-Zelleintritt hemmenden Peptidfraktionen

Die Fraktionen 13-23 (Abbildung 20) wurden in einem ATP-basierten Toxizitäts-Assay getestet (ATPlite, PerkinElmer). In diesem Assay wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Peptidfraktionen inkubiert und das ATP-basierte Luziferase-Signal nach 16 h gemessen. Nur in Verbindung von ATP, welches in einer metabolisch aktiven Zelle vorhanden ist, kann zusammen mit einer hinzugefügten Luziferase und dem Substrat D-Luziferin, ein Lichtsignal generiert und gemessen werden. Die Fraktionen 13, 14, 20-23 wurden bei diesem Toxizitäts-Assay mitverwendet, damit ein eventueller Unterschied in der Toxizität sichtbar wird. Als Positivkontrolle diente hierbei Puromycin. Puromycin hemmt die Proteinsynthese und ist zelltoxisch.

Die Peptidfraktionen 15 und 18 hemmen das Luziferase-Signal ähnlich stark wie die Zelltoxizitätskontrolle Puromycin mit einer Konzentration von 2 mg/ml. Die Peptidfraktionen 16 und 17 senken das Luziferase-Signal sogar so stark herab, dass es nicht mehr detektiert werden konnte (Abbildung 21).



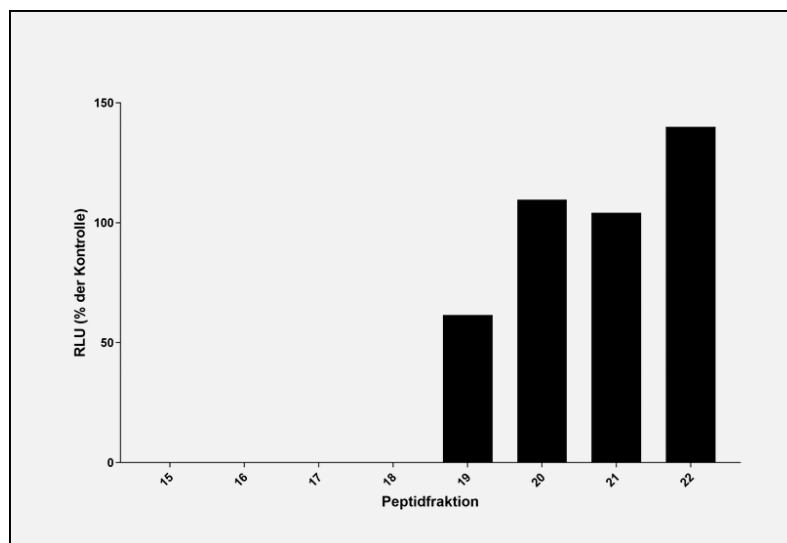
**Abbildung 21: Überprüfung der HF-Peptidfraktionen auf zelltoxische Eigenschaften**

Potentiell EBOV-GP-VP inhibierende HF-Peptide wurden in einem ATP-basierten Assay auf Zelltoxizität getestet. Dafür wurden sie 16h mit HEK293T-Zellen inkubiert und die Lumineszenz als relative Lichteinheiten (*relative light units*-RLU) detektiert.

#### 4.1.4 Peptidfraktionen hemmen Luziferaseaktivität

In dem ATP-basierten Luziferase-Zelltoxizitäts-Assay konnte gezeigt werden, dass das Luziferase-Signal genauso stark wie in der verwendeten Puromycin-Kontrolle herunterreguliert wird (Abbildung 21), was auf eine Zelltoxizität bedeutet. Da es sich bei dem Zelltoxizitäts-Assay um einen Luziferase-basierten Assay handelt, sollte ausgeschlossen werden, dass nicht nur die Luziferase-Enzymaktivität gehemmt wird. Dafür wurden Zellen (HEK293) verwendet, die stabil die Luziferase exprimieren. Die Zellen wurden mit den Peptidfraktionen inkubiert und anschließend das Substrat D-Luziferin hinzugegeben und das Luziferase-Signal gemessen.

Das Luziferase-Signal wurde bei Inkubation der Peptidfraktionen 15-18 mit den HEK293-Luci-Zellen stark gehemmt (Abbildung 22). Es handelt sich demnach um Luziferase-hemmende Peptide und nicht wie anfangs vermutet um spezifische Ebolavirus-Zelleintrittshemmer. Daher erfolgten keine weiteren Peptidscreens und das Projekt wurde eingestellt.



**Abbildung 22: Peptidfraktionen hemmen die Luziferase-Enzymaktivität**

HEK293-Zellen, welche das Luziferase-Gen stabil exprimieren, wurden mit den potentiell EBOV-GP-VP inhibierenden HF-Peptiden inkubiert und das Luziferase-Signal nach 16h gemessen.

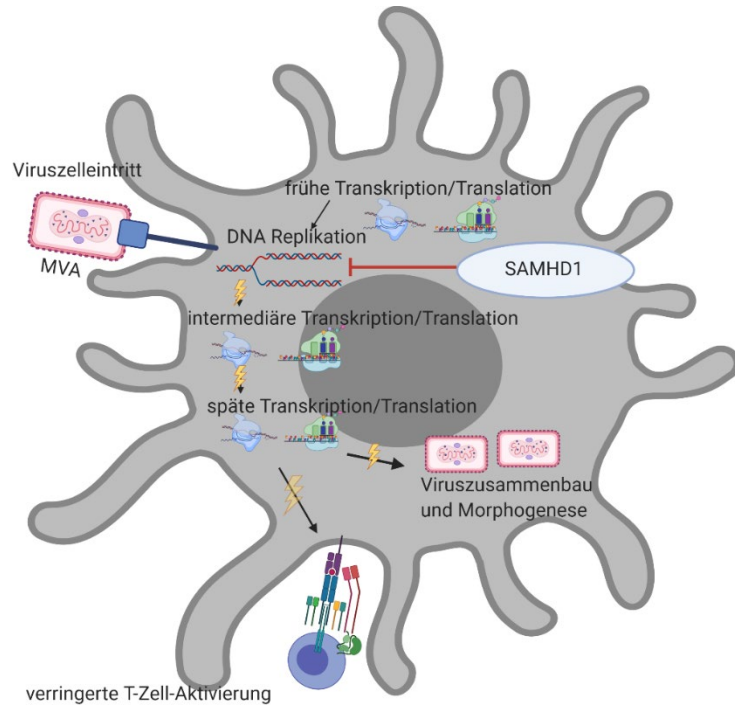
## 4.2 Charakterisierung eines optimierten Pockenvirus-Impfvektors

Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung der Ebolavirus-Erkrankung ist die Prävention der Ebolavirus-Erkrankung durch eine Impfung. Durch die große Ebolavirus-Epidemie im Jahre 2014 - 2016 wurde die Forschung zu einer Ebolavirus-Impfung intensiviert. Dabei wurden verschiedene Impfstoffe entwickelt, von denen *Ervebo* (rVSVΔ-ZEBOV) als Einzeldosis (Merck Sharp & Dohme B.V.) und *Zabdeno* (Ad26.ZEBOV) von Janssen, der in Kombination mit dem booster *Mvabea* (MVA-BN-Filo) von Bavarian Nordic verabreicht wird (Janssen, plus Bavarian Nordic, 2020), 2020 zugelassen.

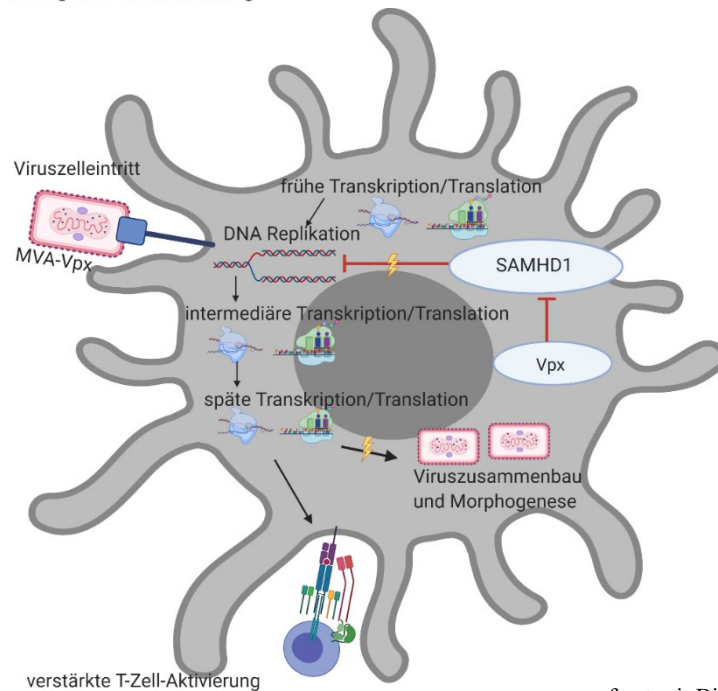
Oftmals wird MVA als Verstärker (*boost*) eines vorausgegangenen *prime*-Impfvektors wie es bei der Ebolavirus-Impfung von Janssen (Ad26-ZEBOV) und Bavarian Nordic (MVA-BN-Filo) der Fall ist, eingesetzt, da teils in klinischen Phasen die MVA-Impfvektor-Effizienz im Auslösen einer Immunantwort nicht stark genug bzw. nicht langanhaltend war (Meyer et al. 2005). Dies könnte an zellulären antiviralen Proteinen liegen. Es konnte gezeigt werden, dass das antivirale zelluläre Protein SAMHD1 die pockenvirale DNA-Replikation in myeloiden nicht teilenden Zellen, wie Makrophagen hemmt (Hollenbaugh et al. 2013). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die MVA-DNA-Synthese und die anschließende späte Genexpression in humanen dendritischen Zellen blockiert ist (Drillien et al. 2000; Kastenmuller et al. 2006; Chahroudi et al. 2006). Da die zu exprimierenden Antigene oftmals unter einen starken späten MVA-Promotor gebracht werden, ist es wichtig, dass die MVA-DNA-Replikation ablaufen kann. Somit können die Antigene erfolgreich exprimiert werden und von den humanen dendritischen Zellen, den professionell Antigen präsentierenden Zellen, präsentiert werden. Für eine funktionale MVA-DNA-Replikation in humanen dendritischen Zellen muss demnach SAMHD1 abgebaut werden. Virale Proteine wie das Vpx von HIV-2 und SIV führen SAMHD1 dem proteosomalen Abbau zu (Laguette et al. 2011). Aus diesem Grund wurde in Vorarbeiten *vpx* in das MVA-Genom kloniert. Damit sollte die MVA-DNA-Replikation sowie die Expression der späten Gene in humanen dendritischen Zellen zugelassen werden. Die Expression der späten Gene sollte zur Erhöhung der Immunogenität von MVA führen (Abbildung 23). Die DNA-Replikation (Abbildung 25) sowie späte Genexpression in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen (Abbildung 26) wurde getestet sowie die Reifung MVA-Vpx-infizierter dendritischer Zellen (Abbildung 27-33). Des Weiteren wurde die durch MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen ausgelöste T-Zell-Proliferation und -Aktivierung untersucht (Abbildung 33-37). Zusätzlich wurden weitere Analysen zur

Interferonantwort (Abbildung 37, Abbildung 38), der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abbildung 39) und zum Auslösen der Apoptose (Abbildung 40) durch MVA-Vpx infizierte humane dendritische Zellen durchgeführt.

A



B



verfasst mit BioRender.com

**Abbildung 23: Schematische Darstellung der kaskadenartigen MVA (oben) und möglichen MVA-Vpx-Replikation in humanen dendritischen Zellen (unten)**

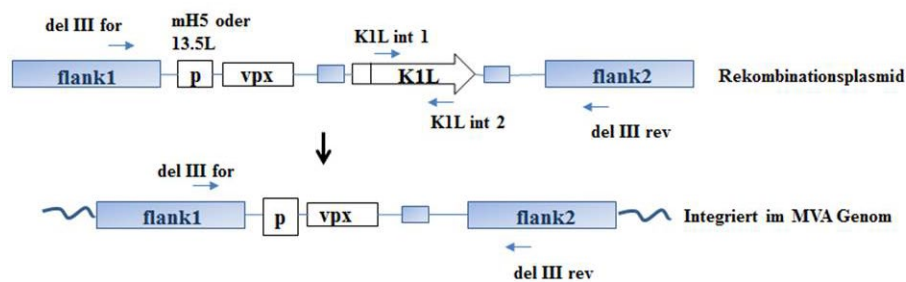
- A) MVA-DNA-Replikation kann in humanen dendritischen Zellen wahrscheinlich durch SAMHD1 nicht stattfinden, wodurch es nicht mehr zur späten Genexpression und zu einer geringeren Immunogenität kommen kann.
- B) MVA-DNA-Replikation könnte durch den Abbau von SAMHD1 durch Vpx wieder stattfinden. Es könnte zur späten Genexpression und zur Ausbildung einer verstärkten, langanhaltenden T-Zell-Immunantwort kommen.

## 4.2.1 Vorarbeiten

Diese hier aufgeführten Vorarbeiten (wurden alle von Dr. Katja Sliva und Christine von Rhein (Abteilung 2/2, Paul-Ehrlich-Institut) durchgeführt und dienen nur dem Verständnis der durchgeführten Experimente und Ergebnisse dieser Arbeit.

### 4.2.1.1 Generierung und Charakterisierung von rekombinanten MVAs, die das SIV-PBj-vpx Gen exprimieren

Es wurden zwei verschiedene MVA-Vpx-Viren im Vorfeld dieser Arbeit generiert. Dabei wurde die *vpx*-Expressionskassette in die Deletion III (del III) Region des MVA-Genoms eingefügt. In MVA-Vpx E/L wurde die Expression von Vpx unter den frühen und späten Promotor mH5 gebracht. In MVA-Vpx IE wurde die Vpx-Expression hingegen unter dem Promotor 13.5L mit sehr früher Expression gebracht (Abbildung Vorarbeiten 1).



#### Abbildung Vorarbeiten 1: Herstellung der rekombinanten MVA-Vpx Viren

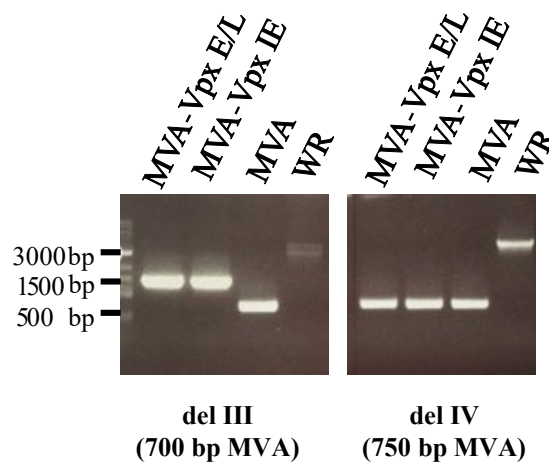
Die Expressionskassette SIV-PBj-vpx wurde durch homologe Rekombination in das MVA-Genom eingefügt. Dabei wurde SIV-PBj-vpx unter zwei verschiedene Promotor exprimiert. mH5 exprimiert Vpx früh und spät und der Promotor 13.5L exprimiert Vpx sehr früh. Die Primer, die an das MVA Genom binden, sind angegeben.



#### 4.2.1.2 Überprüfung der korrekten Insertion der Vpx-Genkassette innerhalb des MVA-Genoms

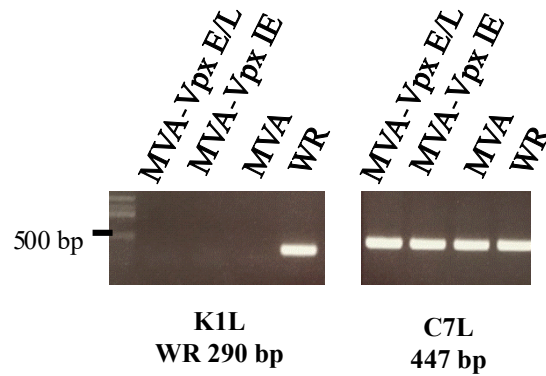
Die genetische Struktur der rekombinanten MVA-Vpx-Viren wurde mittels PCR-Analyse von Klonen, die auf DF-1-Zellen gewachsen sind, verifiziert.

Die Analyse der del III-Region zeigt, dass bei den rekombinanten MVA Vpx-Viren das *vpx*-Gen eingefügt worden ist (Abbildung Vorarbeiten 2). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die del IV-Region (Abbildung Vorarbeiten 2) und das C7L-Gen (Abbildung Vorarbeiten 3) durch das Einfügen der *vpx*-Genkassette nicht verändert worden sind. Das K1L-Gen, welches zur Selektion der rekombinanten Viren verwendet worden ist, ist weiterhin deletiert (Abbildung Vorarbeiten 3).



**Abbildung Vorarbeiten 2: Überprüfung der Regionen del III und del IV der rekombinanten MVA-Vpx Viren**

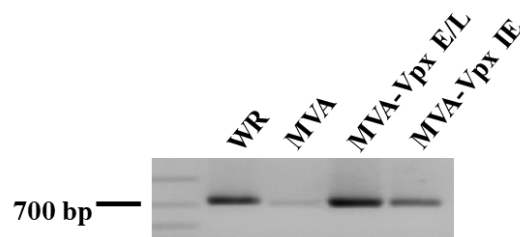
PCR-Analyse mit Primern, die *upstream* und *downstream* der Deletionsregionen III (del III) und IV (del IV) der rekombinanten Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE, sowie des MVA-Wildtyps und des Vakziniavirus *Western Reserve* (WR) binden.



**Abbildung Vorarbeiten 3: Überprüfung der Gene K1L und C7L innerhalb der rekombinanten MVA-Vpx-Viren**

PCR-Analyse mit Primern, die *upstream* und *downstream* der Gene K1L und C7L innerhalb der rekombinanten Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE, sowie des MVA-Wildtyps MVA und des Vakziniavirus *Western Reserve* binden.

Mittels der PCR-Analyse der viralen DNA aus DF-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die die *vpx*-Genkassette an der richtigen Stelle im MVA-Genom eingeführt worden ist. Zur Überprüfung, ob die *vpx*-Genkassette innerhalb der del III-Region vorliegt, wurden Primer verwendet, die sowohl *upstream* und *downstream* des Wildtyp-Promotors 13.5 binden (Abbildung Vorarbeiten 4). Es ist zu erkennen, dass sich die *vpx*-Genkassette nicht zufällig in der Region befindet, sondern tatsächlich in der Region von del III (Abbildung Vorarbeiten 4).



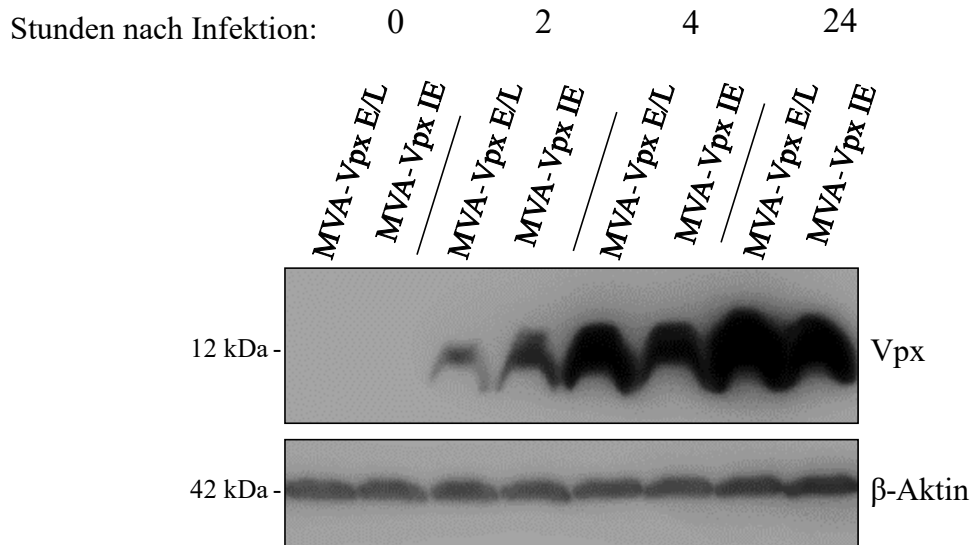
**Abbildung Vorarbeiten 4: Überprüfung der Insertion der Vpx-Genkassette innerhalb der del III-Region**

PCR-Analyse mit Primern, die *upstream* und *downstream* des Promotors 13.5 innerhalb der rekombinanten Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE, sowie des MVA-Wildtyps und des Vakziniavirus *Western Reserve* binden.

#### **4.2.1.3 Überprüfung der Vpx-Expression nach Infektion mit MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE**

Es wurden HeLa-Zellen mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE mit einer MOI 10 infiziert und die Expression von Vpx mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Die HeLa-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion geerntet, um den zeitlichen Verlauf der Vpx-Expression zu analysieren. Des Weiteren geben die verschiedenen Zeitpunkte einen Hinweis auf die Funktionalität der unterschiedlichen Promotoren, die in den rekombinanten MVA-Vpx-Viren verwendet wurden (Abbildung Vorarbeiten 5).

Vpx wurde wie erwartet in den HeLa-Zellen, welche mit den zwei rekombinanten MVA-Vpx-Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE infiziert worden sind, exprimiert. Bei der Analyse der Expression von Vpx wird auch deutlich, dass die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten stattfindet. So erfolgt die Vpx-Expression nach Infektion mit MVA-Vpx E/L, bei dem Vpx unter dem frühen und späten Promotor mH5 exprimiert wird, zwar nach 2 h, allerdings ist die Expression nicht so stark wie bei Infektion mit MVA-Vpx IE, bei dem das Vpx-Gen unter dem sehr frühen Promotor 13.5L exprimiert wird. Die Vpx-Expression ist nach 4h in den Zellen, welche mit MVA-Vpx E/L infiziert worden sind, stärker als in den MVA-Vpx IE-infizierten HeLa-Zellen. Nach 24 h ist die Expression von Vpx noch immer sehr stark in den HeLa-Zellen, die mit den zwei rekombinanten MVA-Vpx-Viren infiziert worden sind. Allerdings ist hier die Expression von Vpx in Zellen, die mit dem rekombinanten MVA-Vpx E/L-Virus infiziert worden sind, höher (Abbildung Vorarbeiten 5).



**Abbildung Vorarbeiten 5: Überprüfung des Zeitpunktes der Expression von Vpx nach Infektion von HeLa-Zellen mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren**

HeLa-Zellen wurden mit den rekombinanten MVA-Vpx E/L - und MVA-Vpx IE- Viren mit einer MOI 10 infiziert und nach 0h, 2h, 4h und 24h lysiert. Der Immunoblot-Nachweis erfolgte mithilfe eines spezifischen Vpx-Antikörpers und eines entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers.

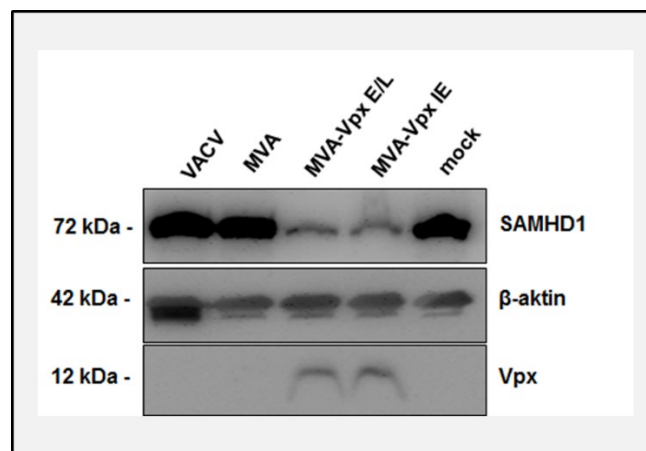
#### 4.2.2 Expression von SAMHD1 und Vpx in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen

Nachdem durch Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass Vpx erfolgreich in das MVA-Genom eingebaut wird und auch exprimiert wird (Abbildung Vorarbeiten 2 – 5), erfolgten weitere Untersuchungen. Es wurden folgende Pockenviren verglichen: Pockenvirus *Western Reserve* (in dieser Arbeit abgekürzt als VACV), das Modifizierte Vakziniavirus Ankara (in dieser Arbeit abgekürzt als MVA), das rekombinante MVA, bei dem die Expression von Vpx unter einem frühen und späten Promotor erfolgt (in dieser Arbeit abgekürzt als MVA-Vpx E/L), das rekombinante MVA bei dem die Expression von Vpx unter einem sehr frühen Promotor erfolgt (in dieser Arbeit abgekürzt als MVA-Vpx IE). Zunächst wurde die Expression von SAMHD1 und Vpx in humanen dendritischen Zellen untersucht, welche mit den verschiedenen Pockenviren infiziert wurden.

SAMHD1 sorgt als Phosphohydrolase dafür, dass dNTPs zu anorganischem Phosphat und 2'-Deoxynukleotiden umgewandelt werden, was die zelluläre dNTP-Konzentration reduziert (Goldstone et al. 2011; Kim et al. 2012). Somit bewirkt SAMHD1 als antiviraler Faktor, vor allem in sich nicht-teilenden myeloiden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen, dass der dNTP-Pool limitiert ist (Lahouassa et al. 2012). Aber auch für DNA-Viren (wie das Pockenvirus) ist bekannt, dass SAMHD1 die DNA-Replikation durch die Reduzierung der zellulären dNTP-Menge hemmt (Hollenbaugh et al. 2013). Vpx, ein virales Protein von HIV-2 und SIV kann SAMHD1 den proteosomalen Abbau zuzuführen (Laguette et al. 2011). Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob SAMHD1 durch das vorhandene Vpx im MVA-Genom in humanen dendritischen Zellen exprimiert wird und SAMHD1 somit dem proteosomalen Abbau zugeführt wird (Abbildung 24).

Um die Expression von SAMHD1 und Vpx nach Infektion mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren zu untersuchen, wurden dendritische Zellen aus humanen Monozyten mittels der Ficoll-Dichtegradienten-Aufreinigung aus Buffy Coats isoliert und anschließend mit IL-4 und GM-CSF zu humanen dendritischen Zellen differenziert. Nach 5-tägiger Inkubation erfolgte die Infektion der humanen dendritischen Zellen mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI von 3 sowie zum Vergleich mit dem MVA-Wildtyp (MVA) und dem VACV. 6 Stunden nach Infektion (*hours post infection-h.p.i.*) wurden die humanen dendritischen Zellen lysiert und mittels Immunoblot auf die Expression von SAMHD1 und Vpx untersucht (Abbildung 24).

In den humanen dendritischen Zellen, die mit den rekombinanten MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE-Viren infiziert worden sind, wird Vpx exprimiert, während, wie zu erwarten war, keine Expression von Vpx in dendritischen Zellen zu sehen ist, die mit VACV oder MVA infiziert wurden (Abbildung 24). Die SAMHD1-Proteinmenge war nach Infektion der dendritischen Zellen mit den rekombinanten MVA-Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE geringer als in dendritischen Zellen, die mit dem MVA-Virus infiziert wurden (Abbildung 24). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass SAMHD1 in den MVA-Vpx-infizierten Zellen abgebaut wurde, Vpx also nicht nur exprimiert wird, sondern auch funktionsfähig ist.

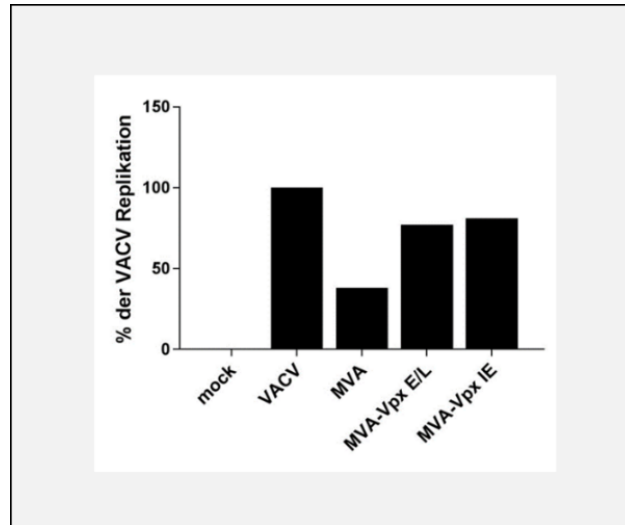


**Abbildung 24: Verringerung der SAMHD1-Proteinmenge in Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

Humane dendritische Zellen wurden mit VACV-, MVA-, MVA-Vpx E/L - und MVA-Vpx IE-Viren mit einer MOI 3 für 6 h infiziert. Der Nachweis von Vpx und SAMHD1 erfolgte mithilfe eines spezifischen Primär-Antikörpers und eines entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers.

### 4.2.3 DNA-Replikation in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen

In den dendritischen Zellen, die mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren infiziert worden sind, war die SAMHD1-Proteinmenge verringert. (Abbildung 24). Es wurde angenommen, dass durch die Verringerung der SAMHD1-Proteinmenge, die MVA-DNA-Replikation in humanen dendritischen Zellen wiederhergestellt werden kann. Um dies zu testen, wurden von der Bachelorstudentin Anastasya Weirich, humane dendritische Zellen aus Buffy Coats wie oben beschrieben (4.2.2), hergestellt und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI von 3, sowie zum Vergleich mit dem MVA-Virus- und dem VACV-Virus infiziert. Nach 24 h.p.i. wurden die Zellen geerntet. Die DNA wurde isoliert und die virale Replikation nachfolgend anhand des hochkonservierten *rpo18* Gens, welches eine Untereinheit der RNA-Polymerase ist, mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*-PCR) analysiert (Abbildung 25). Die *template*-DNA wurde von den infizierten dendritischen Zellen isoliert. Es wurde immer dieselbe Menge der *template* DNA für jede Reaktion verwendet. Die Anzahl der Kopien nach einer VACV-Infektion wurde auf 100 % gesetzt. Es fällt auf, dass die DNA-Replikation von MVA bei 30 % von der DNA-Replikation von VACV liegt. Allerdings ist die DNA-Replikation der rekombinanten MVA-Vpx Viren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE in dendritischen Zellen, höher als jene von MVA. Die DNA-Replikation von MVA-Vpx E/L liegt bei 77% und bei dem MVA-Vpx IE Virus sogar bei 81% (Abbildung 25). (Daten von Anastasia Weirich, generiert in ihrer Bachelorarbeit 2017)



**Abbildung 25: Erhöhung der DNA-Replikation in MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen**

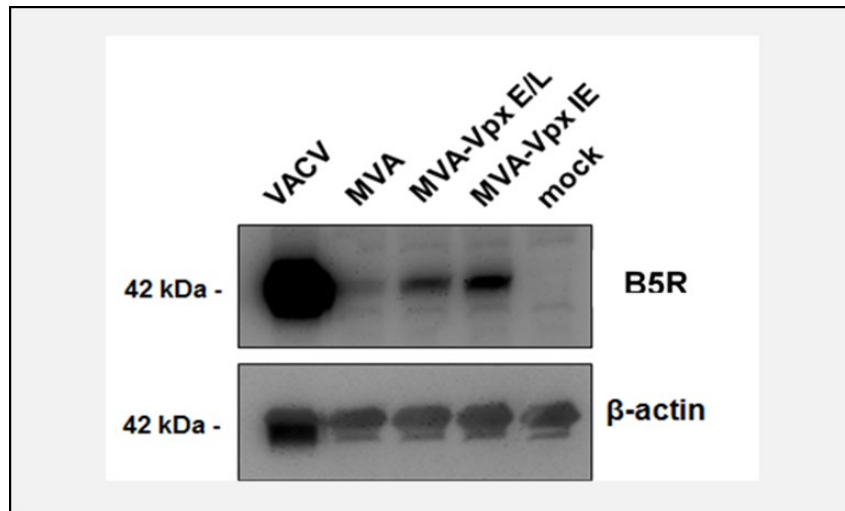
Humane dendritische Zellen wurden mit VACV-, MVA-, MVA-Vpx E/L - und MVA-Vpx IE-Viren mit einer MOI 3 für 24 h infiziert. Die virale DNA-Replikation wurde durch quantitative real-time PCR des hoch konservierten *rpo18* Gens analysiert. Die template DNA (37,5 g) wurde aus den infizierten humanen dendritischen Zellen verwendet. Die Menge an DNA in VACV-infizierten dendritischen Zellen wurde auf 100% gesetzt.



#### **4.2.4 Späte Genexpression in MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die genetische Verlinkung von Vpx mit MVA eine Auswirkung auf die MVA-DNA-Replikation in humanen dendritischen Zellen hat (Abbildung 25), wurde getestet, ob die Expression der späten Proteine durch die Ko-Expression von Vpx und dem daraus resultierenden möglichen SAMHD1-Abbau in dendritischen Zellen wiederhergestellt werden kann. Dafür wurden dendritische Zellen wie zuvor erklärt aus Buffy Coats isoliert (4.2.2) und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 1 sowie zum Vergleich mit dem MVA und dem VACV infiziert. Nach 6 h.p.i. wurden die dendritischen Zellen lysiert und mittels Immunoblot auf die Expression des späten Genprodukts B5R untersucht (Abbildung 26).

Die Expression des späten Proteins B5R ist in humanen dendritischen Zellen, welche mit den rekombinanten MVA-Vpx Viren infiziert wurden, höher, als in den MVA-infizierten humanen dendritischen Zellen (Abbildung 26). Auffällig ist auch, dass bei Infektion mit MVA-Vpx IE die Expression von B5R etwas stärker zu sein scheint als bei Infektion mit MVA-Vpx E/L. Dies spiegelt die Ergebnisse der DNA-Replikation (Abbildung 25) wider. Dort war die DNA-Replikation in MVA-Vpx IE-infizierten dendritischen Zellen auch höher als jene in MVA-Vpx E/L -infizierten Zellen. Wurden dendritische Zellen mit dem VACV infiziert, wurde B5R sehr stark exprimiert (Abbildung 26), was damit zu erklären ist, dass replikationskompetente Pockenviren wie *Western Reserve* andere immunregulierende Enzyme besitzen, die eine DNA-Replikation erlauben (Hollenbaugh et al. 2013). Dadurch kann es wie auch bereits in Abbildung 25 zu erkennen ist, zur DNA-Replikation kommen und somit auch zur späten Genexpression (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Expression des späten Proteins B5R in Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

Humane dendritische Zellen wurden mit VACV-, MVA-, MVA-Vpx E/L - und MVA-Vpx IE-Viren mit einer MOI 1 für 6 h infiziert und anschließend lysiert. Der Nachweis von B5R erfolgte mithilfe eines spezifischen Primär-Antikörpers und eines entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers.

### 4.2.5 Reifung humaner dendritischer Zellen durch MVA-Vpx-Infektion

Durch die genetische Verlinkung von MVA mit Vpx konnte die Expression von SAMHD1 reduziert werden (Abbildung 24). Die DNA-Replikation (Abbildung 25) sowie die späte Genexpression konnte wiederhergestellt werden (Abbildung 26). Um einen Eindruck zu bekommen, ob sich die Immunogenität von MVA durch Vpx nach Infektion verändern könnte, wurde zunächst die Reifung der dendritischen Zellen nach Infektion der rekombinanten MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE untersucht.

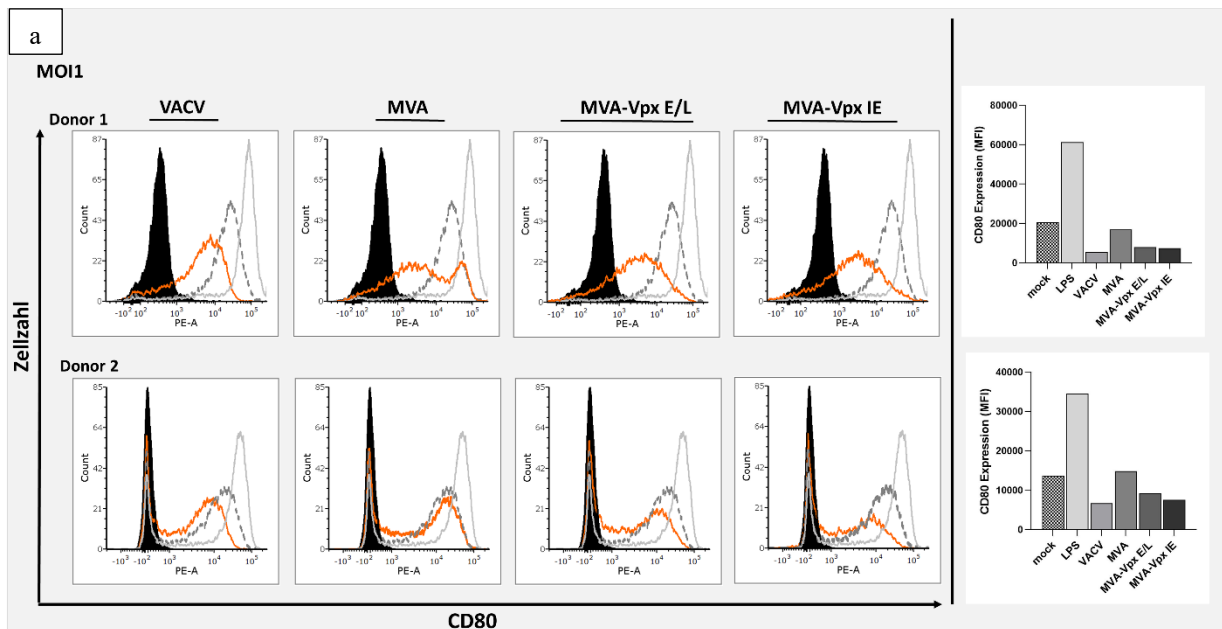
#### 4.2.5.1 CD80- und CD86-Expression auf MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen

Reife dendritische Zellen sind vor allem durch die Expression von kostimulierenden Molekülen wie CD80 und CD86 sowie der MHC-Moleküle I und II gekennzeichnet (Banchereau und Steinmann 1998). Nur wenn die kostimulierenden Moleküle exprimiert werden, können die dendritische Zellen ihre volle Kapazität als antigen-präsentierende Zellen entfalten und naive T-Zellen stimulieren zu proliferieren. In der Literatur wurde gezeigt, dass MVA für einen Anstieg in der CD80- und CD86-Expression sorgt (Drillien et al. 2004), während VACV-infizierte dendritische Zellen keine Erhöhung in der CD86-Expression zeigen und die CD80-Expression sogar herunterreguliert wird (Drillien et al. 2000). Inwiefern die Expression des SIV-Gens *vpx* bei MVA die CD80- und CD86-Expression beeinflusst, sollte mit dem nachfolgenden Experiment untersucht werden (Abbildung 27, Abbildung 28).

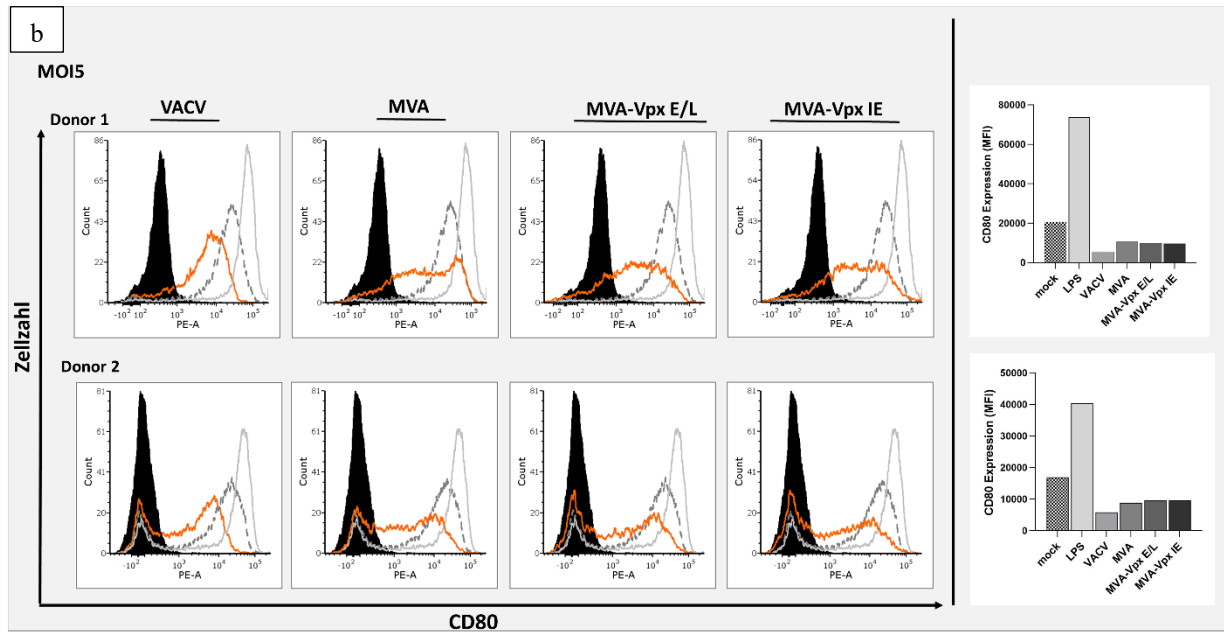
Dafür wurden dendritische Zellen wie oben beschrieben aus Buffy Coats erzeugt (4.2.2). Nach 5-tägiger Inkubation erfolgte die Infektion der dendritischen Zellen mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 1 sowie zum Vergleich mit dem MVA und dem VACV. Nach 16 h.p.i. wurden die dendritischen Zellen geerntet und mittels fluoreszenzzytometrischer Analysen die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 untersucht. Lipopolysachharid (LPS) diente als Kontrolle (Abbildung 27, Abbildung 28). LPS ist z.B. als Bestandteil von gramnegativen Bakterien ein sogenanntes Pathogen-assoziiertes-molekulares Muster (*pathogen associated molecular pattern* PAMP), welches auf den dendritischen Zellen an den Toll-like Rezeptor 4 (*Toll like Receptor* 4-TLR) bindet und eine Signalkaskade ausführt, die unter anderem zur Reifung der dendritischen Zellen führt. Es wurden humane dendritische Zellen von zwei verschiedenen anonymen Spendern ausgewertet. Da mit  $n = 2$  Spendern keine statistische Aussage getroffen werden kann, ist folglich nur von Annahmen die Rede.

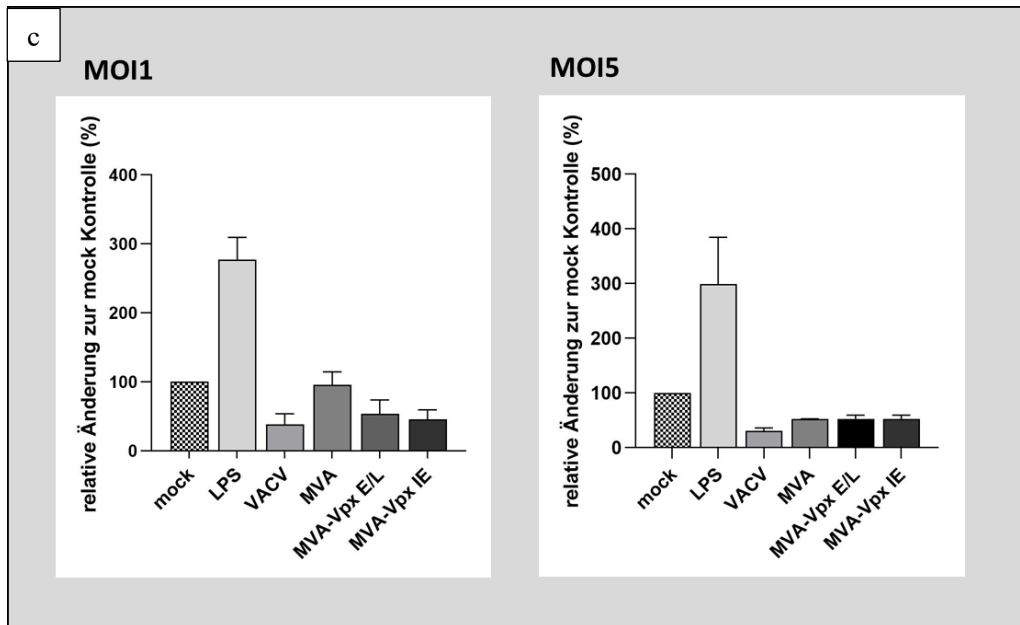
In der Abbildung 27 c kann angenommen werden, dass humane dendritische Zellen, die mit den MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE-Viren mit einer MOI 1 infiziert wurden, CD80 nicht so

stark exprimieren wie MVA-infizierte und uninfizierte dendritische Zellen. Ein geringer Unterschied innerhalb der CD80-Expression deutet sich zwischen MVA-infizierten und uninfizierten (*mock*) dendritischen Zellen bei einer MOI 1 an (Abbildung 27 c). MVA-infizierte dendritische Zellen scheinen etwas weniger CD80-Moleküle zu exprimieren als uninfizierte dendritische Zellen. Bei einer MOI 5 scheint die CD80-Expression von MVA- und MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen gleich hoch zu sein, jedoch niedriger als auf uninfizierten dendritischen Zellen (Abbildung 27 c). VACV-infizierten dendritischen Zellen scheinen weniger CD80, sowohl bei einer MOI 1 als auch bei einer MOI 5, als die MVA-Vpx-infizierten, MVA-infizierten und uninfizierten dendritischen Zellen zu exprimieren (Abbildung 27 c).



# ERGEBNISSE



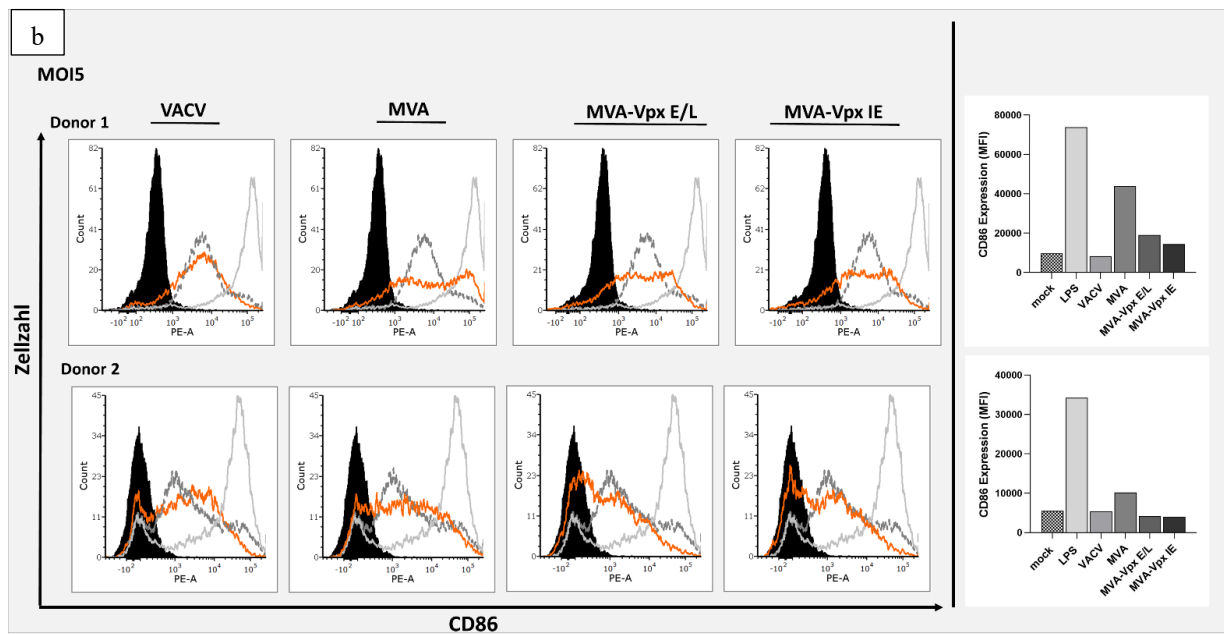
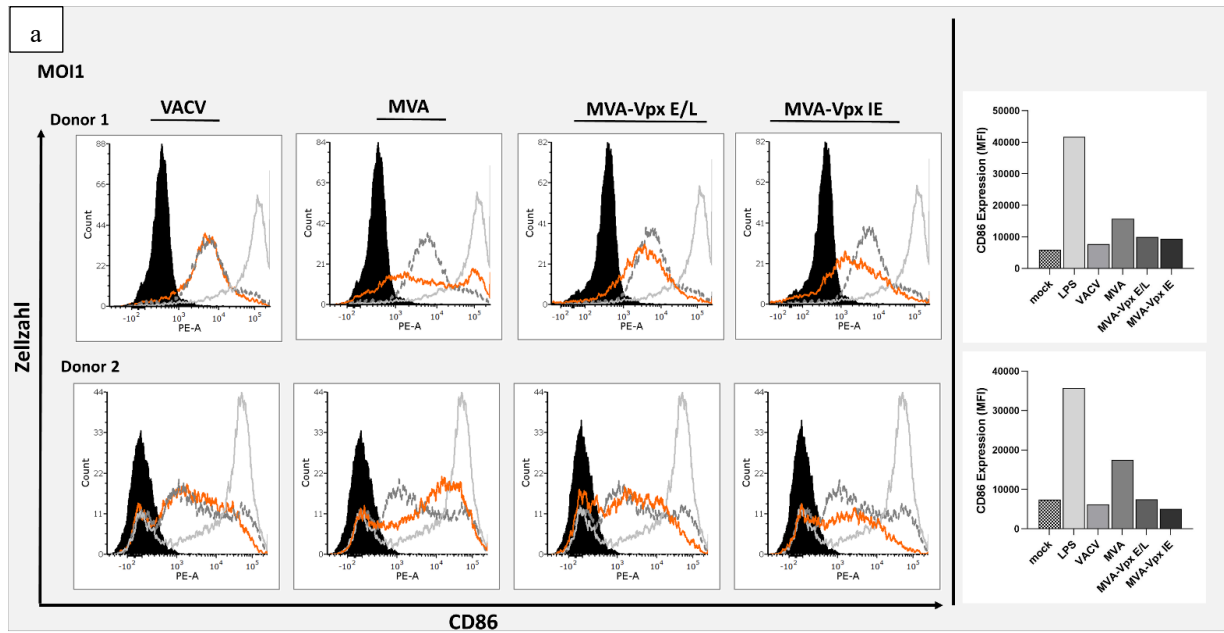


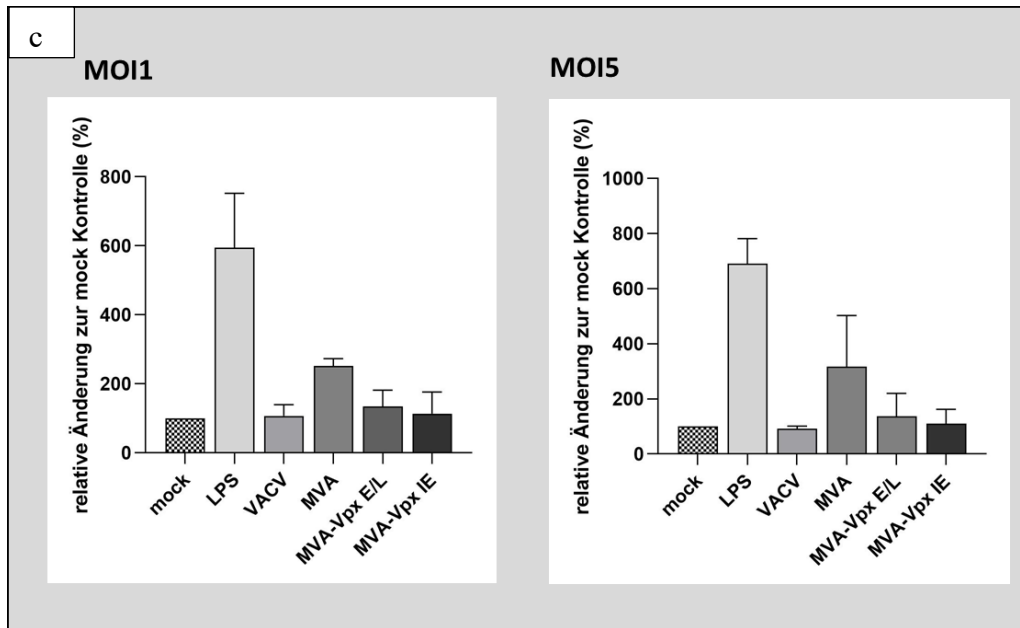
**Abbildung 27: CD80-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- CD80-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und einer MOI 1. CD80-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten CD80-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninanzierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- CD80-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und einer MOI 5. CD80-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten CD80-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninanzierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- Zusammenfassende Analyse der in a) und b) dargestellten Ergebnisse ausgedrückt in der relativen X-fachen Veränderung (fold change) der infizierten humanen dendritischen Zellen zu uninanzierten (*mock*) humanen dendritischen Zellen

MVA scheint die CD86-Expression auf humanen dendritischen Zellen mit einer MOI 1 im Vergleich zur uninanzierten (*mock*)-Kontrolle zu erhöhen. Die MVA-Vpx-Viren scheinen CD86 ähnlich stark zu exprimieren wie VACV oder uninanzierte dendritische Zellen, bei einer MOI 1 jedoch weniger als MVA-infizierte humane dendritische Zellen (Abbildung 28 c). Bei einer MOI 5 kann durch die hohe Standardabweichung bei MVA angenommen werden, dass MVA-infizierte und MVA-Vpx infizierte humane dendritische Zellen CD86 ähnlich stark exprimieren (Abbildung 28 c), auch wenn sich bei der Analyse der einzelnen Spender andeutet, dass MVA-infizierte dendritische Zellen mehr CD86 exprimieren als MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen (Abbildung 28 b). MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen scheinen CD86 ähnlich stark zu exprimieren wie uninanzierte dendritische Zellen (Abbildung 28 c).

# ERGEBNISSE





**Abbildung 28: CD86-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- a)** CD86-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und einer MOI 1. CD86-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten CD86-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninfizierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- b)** CD86-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und einer MOI 5. CD86-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten CD86-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninfizierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- c)** Zusammenfassende Analyse der in a) und b) dargestellten Ergebnisse ausgedrückt in der relativen X-fachen Veränderung (fold change) der infizierten humanen dendritischen Zellen zu uninfizierten (*mock*) humanen dendritischen Zellen



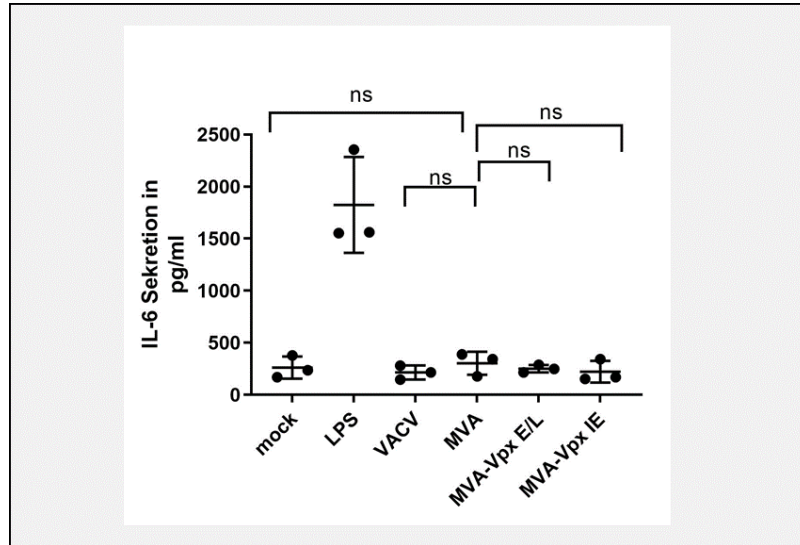
#### **4.2.5.2 IL-6 - und TNF $\alpha$ -Sekretion durch MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen**

Um die Aktivierung der dendritischen Zellen nach Infektion mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren noch weiter zu prüfen, wurde auch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen IL-6 und TNF $\alpha$  untersucht. Es ist bereits bekannt, dass MVA in humanen dendritischen Zellen die Sekretion von IL-6 und TNF $\alpha$  auslösen kann (Delaloye et al. 2009; Ramirez et al. 2000). Vpx hingegen sorgt durch Interaktion mit IRF5 dafür, dass IRF5 seine transaktivierende Funktion wie die Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  nicht ausführen kann (Cheng und Ratner 2014).

Für die Untersuchung der IL-6- und TNF $\alpha$ -Sekretion nach Infektion von humanen dendritischen Zellen durch Pockenviren, wurden humane dendritische Zellen wie oben beschrieben aus Buffy Coats erhalten (4.2.2) und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 1 sowie zum Vergleich mit dem MVA- und dem VACV infiziert. Nach 16 h.p.i. wurde der Überstand der infizierten dendritischen Zellen genommen und mittels eines Enzymgekoppelten ELISA untersucht.

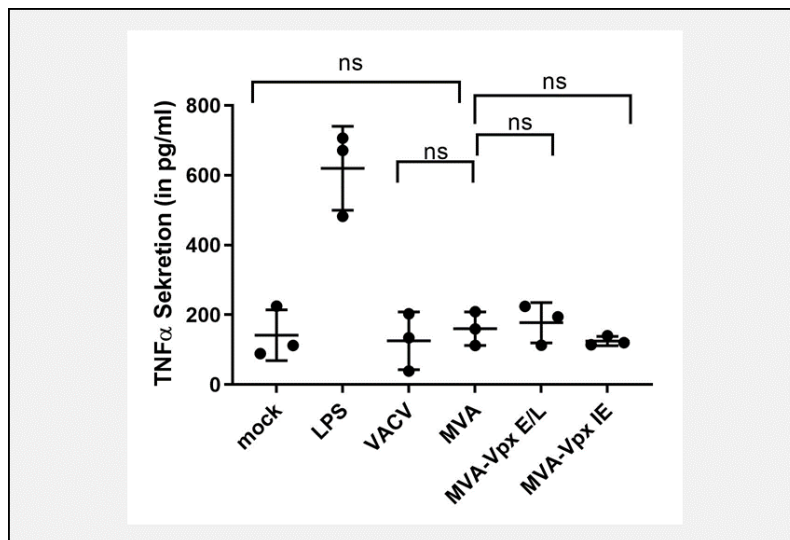
Die Abbildungen 30 und 31 zeigen, dass es auch bei der IL-6- und TNF $\alpha$ -Sekretion nach Infektion mit den rekombinanten MVA-Vpx-Varianten keinen signifikanten Unterschied zu einer Infektion mit dem MVA gibt (Abbildung 29, Abbildung 30). MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen sekretieren ähnliche IL-6-Mengen wie uninfizierte dendritische Zellen. Die mit dem VACV-infizierten dendritischen Zellen sekretieren am wenigsten IL-6. Dort wurden im Durchschnitt nur 214 pg/ml sekretiert (Abbildung 30).

TNF $\alpha$  wird bei den MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen nicht signifikant stärker sekretiert als bei MVA-infizierten oder uninfizierten dendritischen Zellen. Es ist auch kein Unterschied in der TNF $\alpha$ -Sekretion zwischen VACV und MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen zu erkennen (Abbildung 30).



**Abbildung 29: IL-6-Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

IL-6-Sekretion wurde im Überstand nach Infektion (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) von humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen anonymen Spendern mittels enzymgekoppelten ELISA gemessen. Jeder Datenpunkt bedeutet ein Spender. Friedmans-Test mit p-Wert von 0.1217 \* bedeutet signifikanter Unterschied in der IL-6-Sekretion.



**Abbildung 30: TNFα-Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

TNF  $\alpha$ -Sekretion wurde im Überstand nach Infektion (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) von humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen anonymen Spendern mittels enzymgekoppelten ELISA gemessen. Jeder Datenpunkt bedeutet ein Spender. Friedmans-Test mit p-Wert von 0.1463 \* bedeutet signifikanter Unterschied in der TNF $\alpha$ -Sekretion.

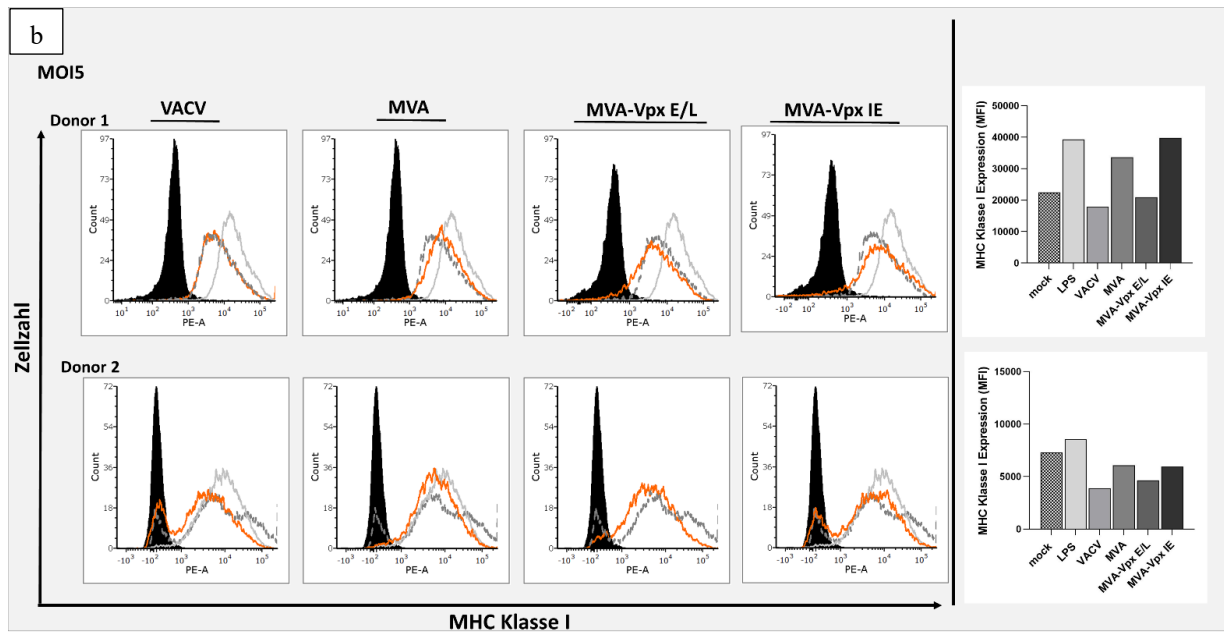
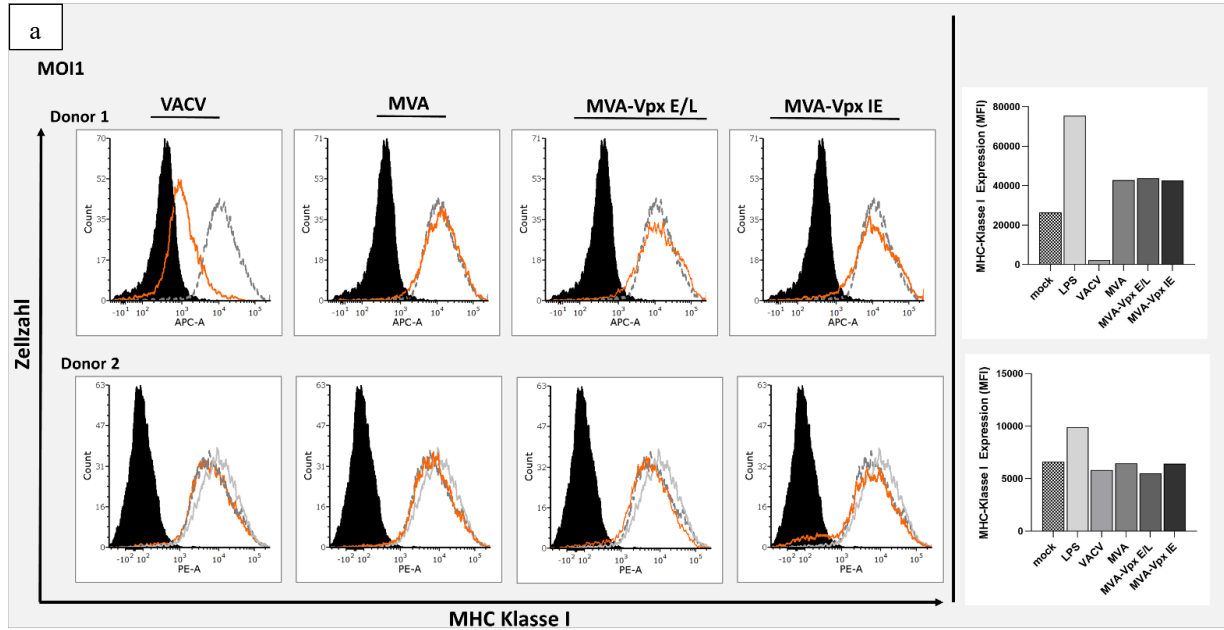
#### 4.2.5.3 MHC I und MHC II-Expression auf MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen

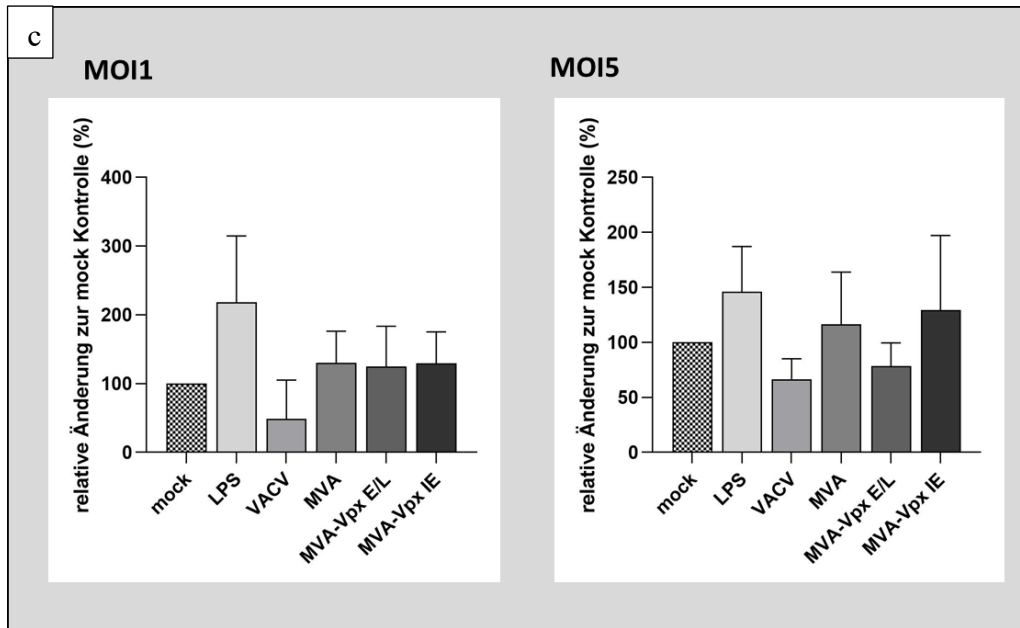
Um herauszufinden, ob die Induktion einer Immunantwort nach Infektion der rekombinanten Viren möglich ist, wurde die MHC-Expression untersucht. MHC-Moleküle sind die Moleküle auf Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*-APC), mithilfe derer die Antigene den T-Zellen präsentiert werden. Dabei bindet der T-Zell-Rezeptor einer CD8<sup>+</sup>-T-Zelle an ein MHC I und der T-Zell-Rezeptor einer CD4<sup>+</sup>-T-Zelle an ein MHC II-Molekül auf einer dendritischen Zelle. MHC I und II werden in VACV-infizierten humanen dendritischen Zellen nicht stark exprimiert (Drillien et al. 2000), während es eine Erhöhung in der Expression von MHC I und II Molekülen nach Infektion mit dem MVA-Virus gibt (Pascutti et al. 2011). Inwiefern die Ko-Expression von Vpx bei MVA die MHC I und II beeinflusst, sollte mit dem nachfolgenden Experiment untersucht werden.

Dafür wurden dendritische Zellen wie oben beschrieben aus Buffy Coats erzeugt (4.2.2) und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 1 sowie zum Vergleich mit dem MVA und dem VACV infiziert. 16 h.p.i. wurden die humanen dendritischen Zellen geerntet und mittels fluoreszenzzytometrische Analysen die Expression der MHC Moleküle I und II untersucht (Abbildung 31, Abbildung 32). Ähnlich wie bei der CD80 und CD86-Expression (Abbildung 27, Abbildung 28) wurden auch hier nur n = 2 Spender getestet, wodurch keine statistische Aussage getroffen werden kann und daher nur von Annahmen die Rede ist.

Bei einer MOI 1 scheint es als würden MVA und MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen ähnlich viel MHC I auf ihrer Oberfläche exprimieren als uninfizierte, jedoch mehr als VACV-infizierte dendritische Zellen (Abbildung 31 c). Durch die Erhöhung der MOI (MOI 5) kommt es zu hohen Schwankungen in den Werten. Es scheint als würden MVA-Vpx E/L und VACV-infizierte dendritische Zellen ähnlich stark MHC I exprimieren, aber weniger als MVA, MVA-Vpx IE und uninfizierte dendritische Zellen (Abbildung 31 c).

# ERGEBNISSE

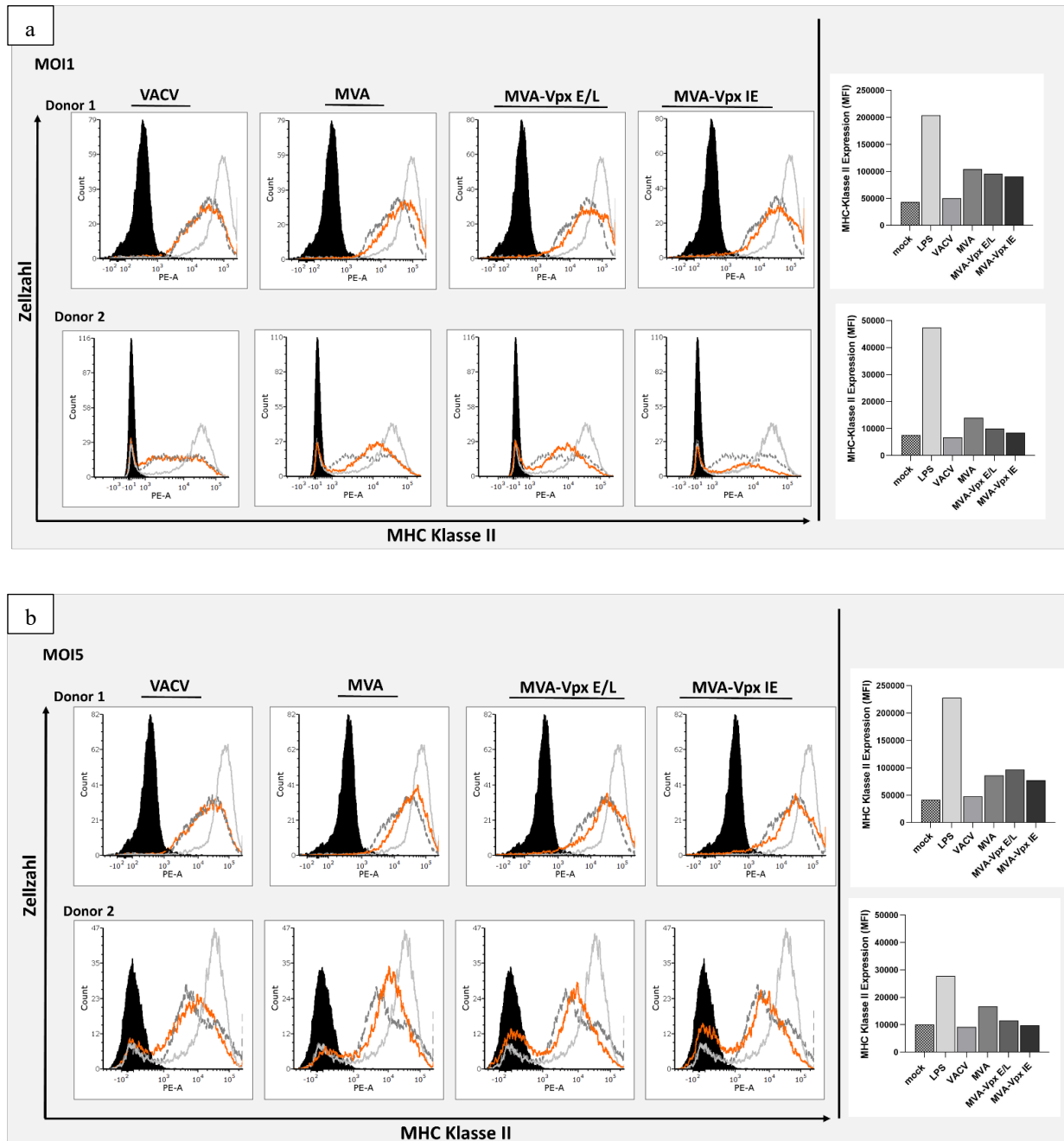


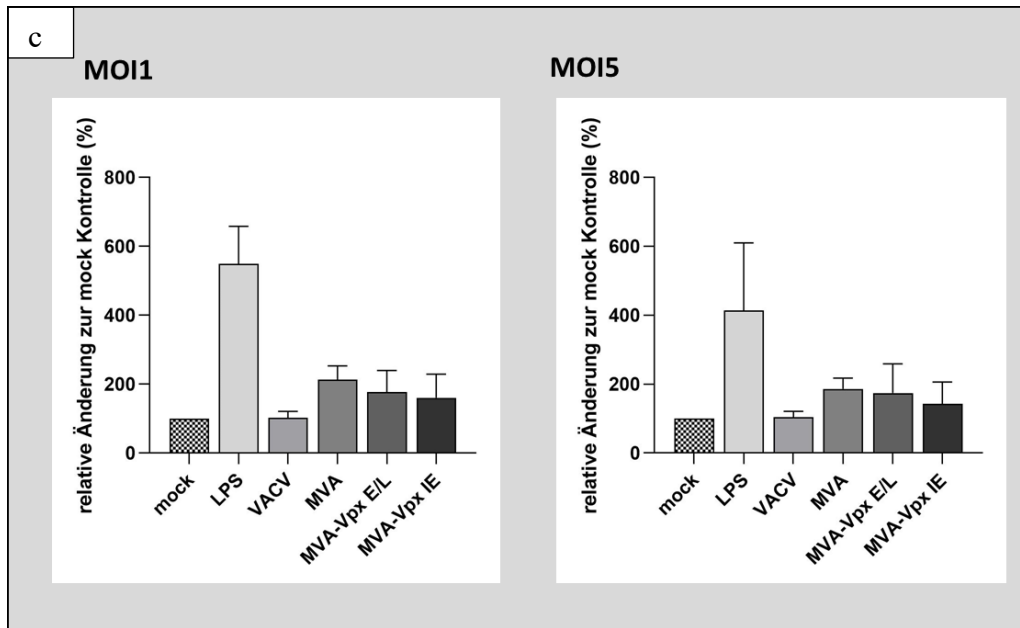


**Abbildung 31: MHC I-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- a) MHC I-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und MOI 1. MHC I-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE oder APC-gekoppelten MHC I-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninanzierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- b) MHC I-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und MOI 5. MHC I-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten MHC I-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninanzierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- c) Zusammenfassende Analyse der in a) und b) dargestellten Ergebnisse ausgedrückt in der relativen X-fachen Veränderung (fold change) der infizierten humanen dendritischen Zellen zu uninanzierten (*mock*) humanen dendritischen Zellen

Die MHC II-Expression scheint von den MVA-infizierten humanen dendritischen Zellen bei einer MOI 1 erhöht zu werden. Es scheint so, dass sie mehr MHC II exprimieren als uninanzierte und VACV-infizierte humane dendritische Zellen (Abbildung 32 c). MVA-Vpx-infizierte humane dendritische Zellen scheinen bei einer MOI 1 etwas mehr MHC II zu exprimieren als uninanzierte oder VACV-infizierte dendritische Zellen, jedoch ähnlich hoch wie MVA-infizierte dendritische Zellen. Bei einer MOI 5 scheint sich das MHC II-Expressionsmuster auf MVA-infizierten dendritischen Zellen nicht zu ändern und bleibt erhöht im Vergleich zu uninanzierten und VACV-infizierten dendritischen Zellen (Abbildung 32 c). MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen exprimieren die MHC II Moleküle bei einer MOI 5 scheinbar ähnlich stark wie uninanzierte und VACV-infizierte dendritische Zellen (Abbildung 32 c).





**Abbildung 32: MHC II-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- a)** MHC II-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und MOI 1. MHC II-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten MHC II-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninanzierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- b)** MHC II-Expression auf infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen von 2 verschiedenen anonymen Spendern nach 16 h.p.i. und MOI 5. MHC II-Expression wurde fluoreszenzzytometrisch mit einem spezifischen PE-gekoppelten MHC II-Antikörper gemessen. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninanzierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- c)** Zusammenfassende Analyse der in a) und b) dargestellten Ergebnisse ausgedrückt in der relativen X-fachen Veränderung (fold change) der infizierten humanen dendritischen Zellen zu den uninanzierten (*mock*) humanen dendritischen Zellen

#### 4.2.6 *In vitro* T-Zell-Proliferation nach MVA-Vpx Infektion

Reife dendritische Zellen können Antigene in einem MHC-Molekül, welche mit einem bestimmten Antigen beladen sind, T-Zellen präsentieren. Diese Bindung sorgt dafür, dass bei ausreichender Bindung zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle, die T-Zellen beginnen zu proliferieren.

Bei einer Impfung soll sich ein immunologisches Gedächtnis bilden, welches unter anderem Gedächtnis-T-Zellen beinhaltet. Kommt ein Geimpfter anschließend noch einmal mit dem Erreger in Kontakt, erkennen die Gedächtnis-T-Zellen die Antigene aufgrund der bereits vorher ausgelösten Immunantwort durch die Impfung, woraufhin eine neue weitaus schwächere Immunreaktion folgen soll. Wie Drillien et al. 2000 beschreiben, sorgte eine Infektion von dendritischen Zellen (von Spendern, die bereits gegen Pockenviren geimpft wurden) mit einem Vakziniavirus dafür, dass autologe periphere Blutlymphozyten (*peripheral blood lymphocytes*-PBL) mit einem guten immunologischen Gedächtnis stark proliferieren. Die Infektion mit dem Vakziniavirus von dendritischen Zellen von Spendern ohne Pockenvirus-Impfung konnte nur eine geringe Proliferation der autologen PBLs auslösen (Drillien et al. 2000). Dies spricht dafür, dass sich nach einer Pockenvirus-Impfung sogenannte Gedächtnis-T-Zellen bilden können, welche nach erneuter Infektion mit einem Pockenvirus das Virus bzw. seine Antigene erkennen und beginnen sich zu teilen.

In einer anderen Studie erreichten MVA-infizierte humane dendritische Zellen eine T-Zell-Proliferation ähnlich hoch wie nach einer Inkubation der humanen dendritischen Zellen mit LPS (Positivkontrolle, als Auslöser für die T-Zell-Proliferation) (Pascutti et al. 2011).

Um zu testen, ob die rekombinanten Pockenviren MVA-Vpx E/L und MVA-Vpx IE in der Lage sind, eine T-Zell-Proliferation *in vitro* auszulösen, wurden humane dendritische Zellen mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren infiziert. Anschließend wurden autologe PBLs hinzugegeben, welche vorher mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) markiert wurden. CFSE wird von den Zellen aufgenommen und nach jeder Teilung an die Tochterzellen weitergegeben. Dadurch halbiert sich der Farbstoff bei jeder Teilung, was anschließend im Durchflusszytometer analysiert werden kann.

Zunächst wurden humane dendritische Zellen wie kürzlich erwähnt (4.2.2) aus Buffy Coats isoliert und differenziert und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 1 sowie zum Vergleich mit MVA und VACV infiziert. Nach 16 h.p.i. wurden die zuvor mit CFSE inkubierten und dadurch gelabelten autologen T-Zellen PBLs hinzugegeben. Es erfolgt eine

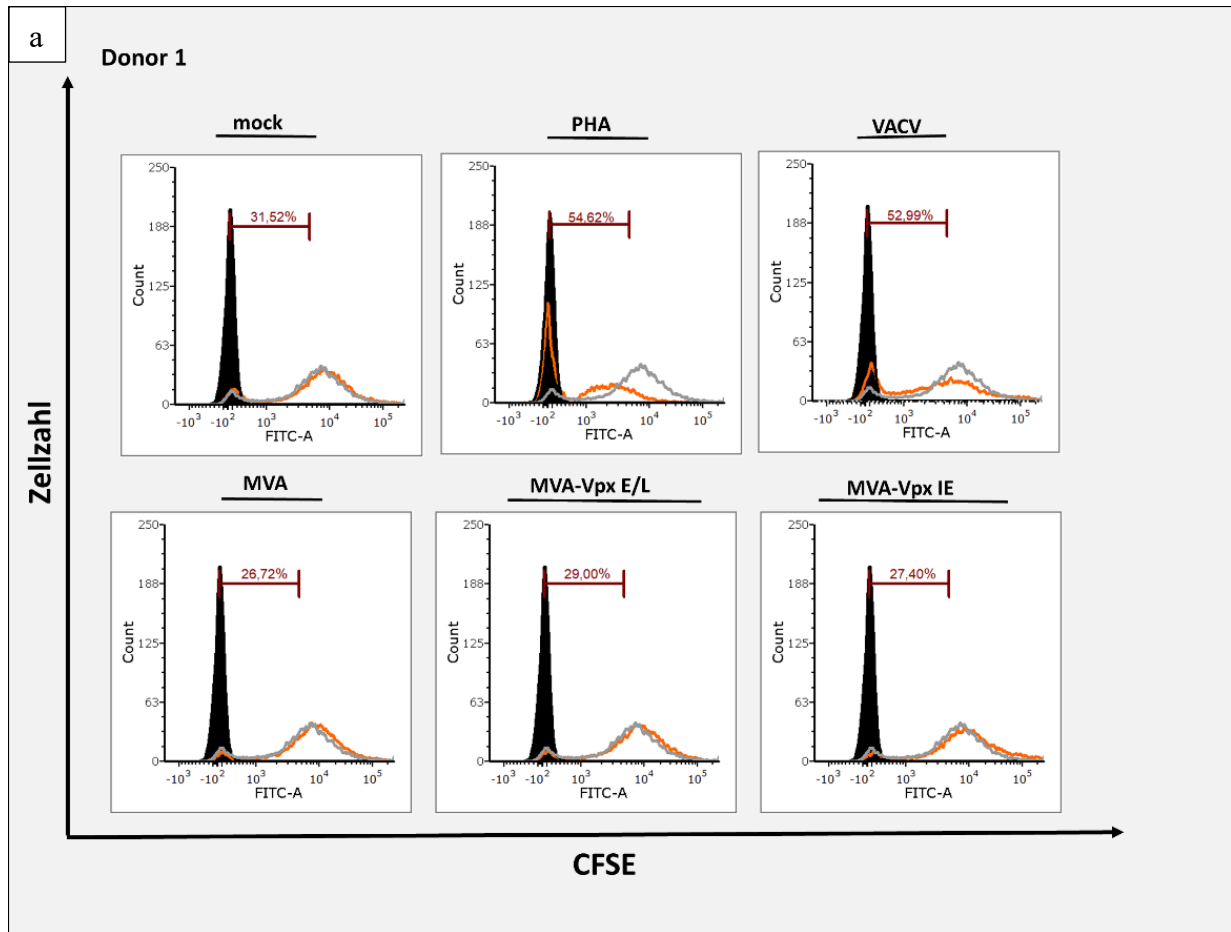


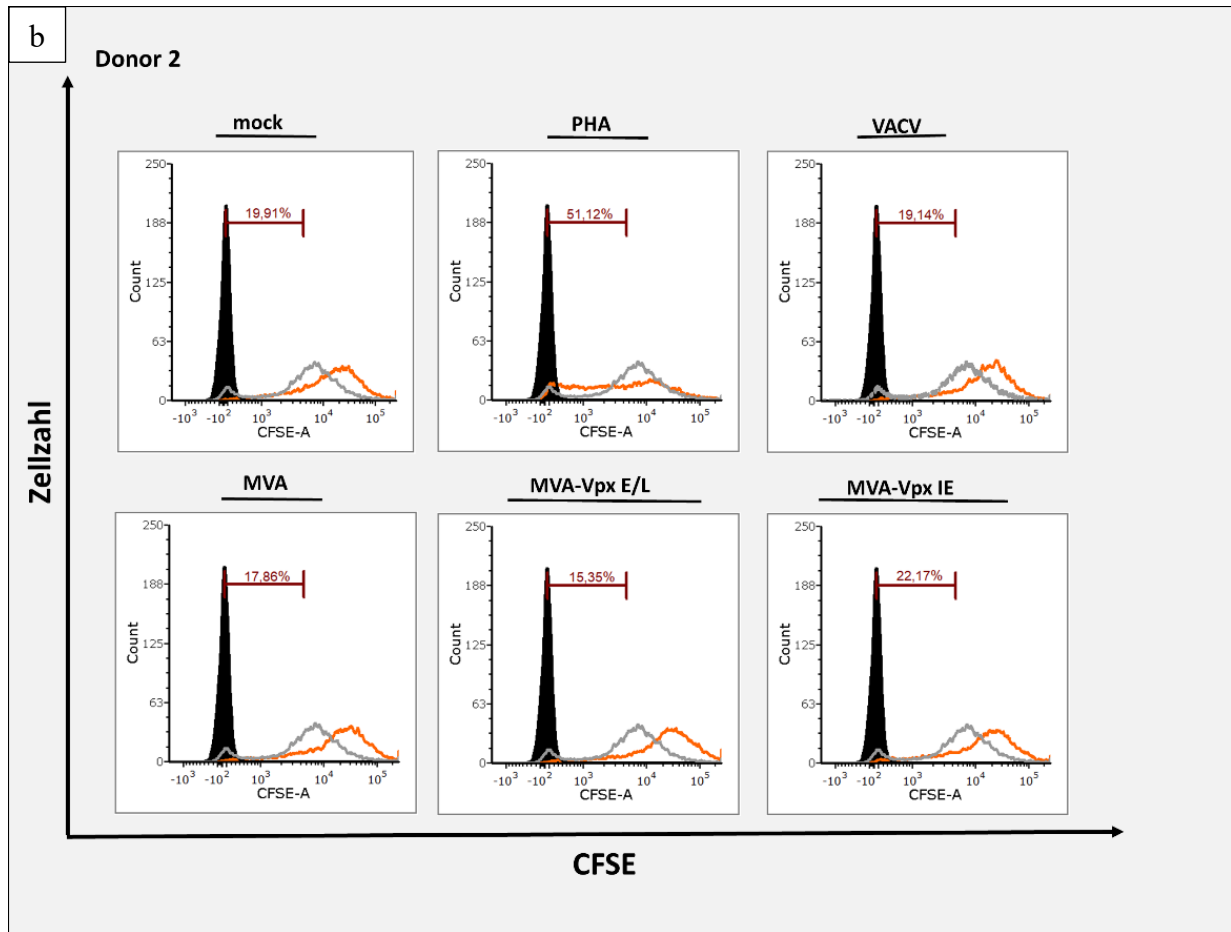
Inkubation über 5 Tage (Abbildung 33). In einem Vorversuch wurden anonyme Spenderzellen verwendet, von denen nicht bekannt war, ob sie bereits eine Pockenimpfung erhalten hatten. Die T-Zellen zeigten keine besondere Reaktion auf die Infektion mit den verschiedenen Pockenviren (Daten nicht gezeigt). Es wurde deshalb wie bei Drillien et al. 2000 Spender ausgewählt, von denen bekannt war, dass sie bereits eine Pockenimpfung erhalten haben.

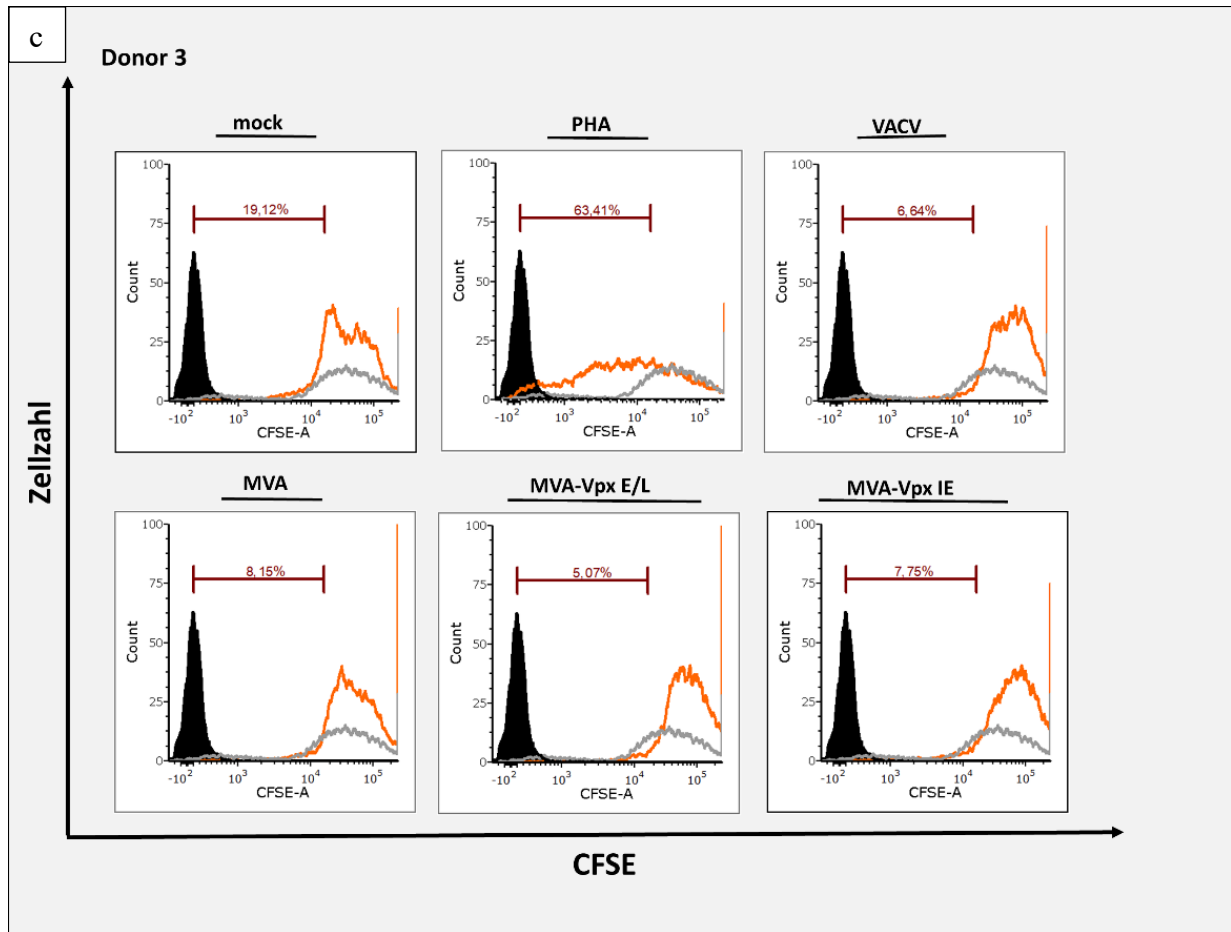
Bei keinem der Spender konnte eine MVA-Infektion, wie zuvor bei Pascutti et al. beschrieben, eine erhöhte T-Zell-Proliferation auslösen (Abbildung 33 a, b, c). Bei Donor 1 war die T-Zell-Proliferation nach Inkubation der MVA-Vpx-infizierten humanen dendritischen Zellen vergleichbar (MVA-Vpx E/L 29% und MVA-Vpx IE 27,4%) mit jener nach Inkubation mit MVA-infizierten humanen dendritischen Zellen (26,7%). Die Inkubation der T-Zellen mit VACV-infizierten humanen dendritischen Zellen, ließ die T-Zellen ähnlich stark proliferieren (53%) wie bei der PHA-Kontrolle (54,6%) (Abbildung 33 a). Die Pockenvirus-Impfung dieses Spenders lag ca. 10 Jahre zurück.

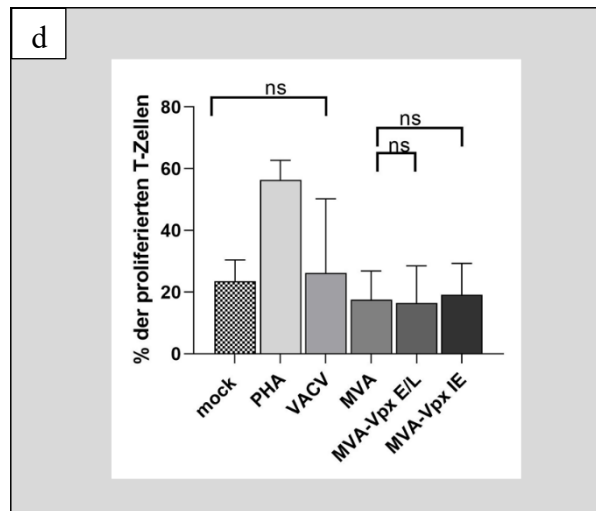
Die T-Zellen von Donor 2 proliferierten nach Inkubation mit den verschiedenen Pockenviren-infizierten humanen dendritischen Zellen sehr wenig (Abbildung 33 b). Dieser Donor hat eine Pockenvirus-Impfung vor ca. 20 Jahren erhalten. Allerdings reagieren die T-Zellen nicht auf eine VACV-Infektion.

Die geringste T-Zell-Proliferationsrate zeigte sich bei Donor 3 nach Infektion mit den einzelnen in dieser Arbeit getesteten Pockenviren (Abbildung 33 c). Nur 6% der T-Zellen, welche mit VACV-infizierten dendritische Zellen inkubiert wurden, proliferierten. Obwohl dieser Donor eine Pockenvirus-Impfung erhalten hat, reagierten die T-Zellen nicht auf eine VACV-Infektion. (Abbildung 33 c). Auffällig ist auch, dass die uninfizierten dendritischen Zellen mehr Proliferation bei T-Zellen auslösen (19%) als die infizierten dendritischen Zellen (Abbildung 33c). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Pockenvirus-Impfung vor ca. 30 Jahren verabreicht wurde.









**Abbildung 33: T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- a) **b) c)** T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen (MOI 1) von 3 verschiedenen Spendern.  
 Schwarz eingefärbt = ungefärbte Kontrolle, grauer Graph = Zeitpunkt 0 (CFSE-gefärbte T-Zellen ohne Inkubation mit humanen dendritischen Zellen), oranger Graph = T-Proliferation nach Inkubation mit infizierten humanen dendritischen Zellen
- a.)** Spender 1 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 10 Jahren erhalten. **b.)** Pockenvirus-Impfung vor ca. 20 Jahren erhalten **c)** Pockenvirus-Impfung vor ca. 30 Jahren erhalten.
- d)** Statistische Auswertung der T-Zell-Proliferation der 3 Spender. Friedmans-Test mit einem p-Wert=0.0427.

#### 4.2.7 Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern nach MVA-Vpx Infektion

Bei der Entwicklung von T-Zell-induzierten Vakzinen werden immer mehr auch die Aktivierungs-induzierten Marker (AIM), welche sich auf den T-Zellen befinden, analysiert. Dies gibt einen breiteren Einblick in die Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten (Bowyer et al. 2018).

Um einen Hinweis darauf zu bekommen wie sich T-Zellen verhalten, wenn sie mit MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen inkubiert werden, wurde die Expression von T-Zellmarkern untersucht, die als sogenannte Aktivierungsmarker bekannt sind. Dabei wurden Marker wie die Aktivierungsmarker CD69, CD107a und CD137 gewählt, welche verstärkt auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert werden. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind dafür bekannt Zielzellen (z.B. virusinfizierte Zellen) durch 2 verschiedene Mechanismen zu töten. Zum einen gibt es den Granula-abhängigen (mit Perforin und Granzymen) und den unabhängigen Mechanismus (Ligand bindet an Rezeptor, was den Zelltod auslöst) (Trapani und Smyth 2002).

CD69 ist einer der ersten Rezeptoren, welche auf T-Zellen nach Bindung des T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplexes exprimiert wird. CD69 agiert als ko-stimulierendes Molekül für die T-Zell-Aktivierung und Proliferation (Ziegler et al. 1994).

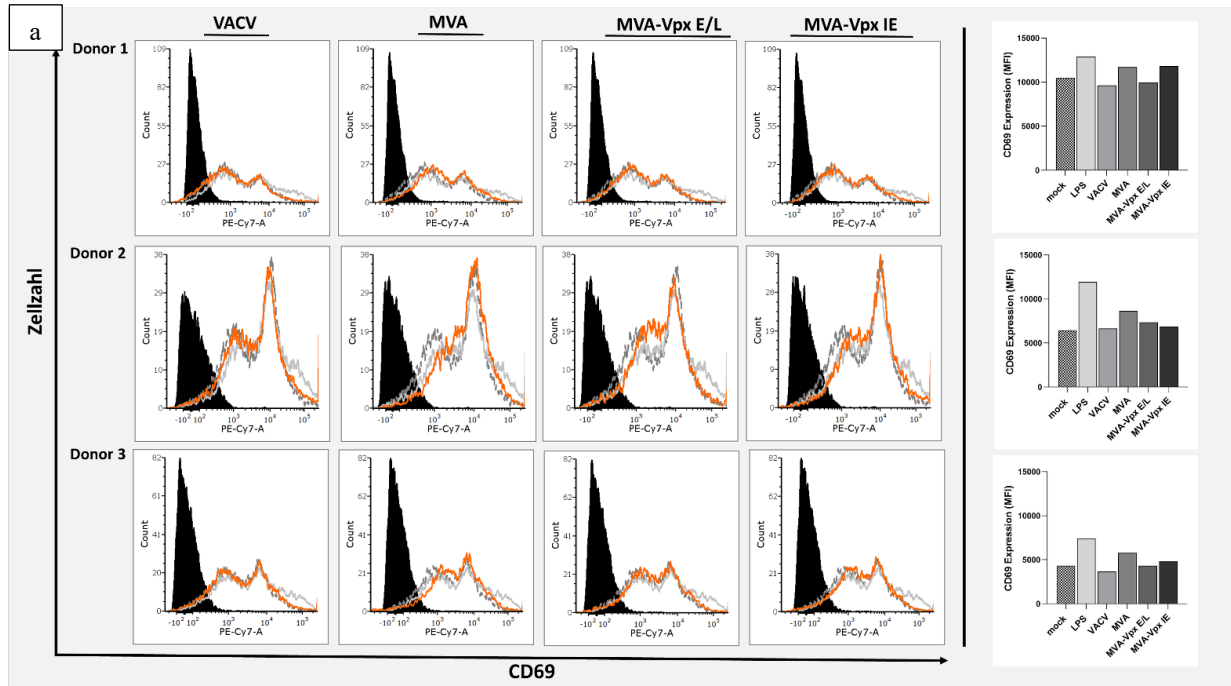
CD107a oder auch bekannt als Lysosomal-assoziiertes Membranprotein ist ein Marker für die Degranulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, welcher nur bei Aktivierung auf den T-Zellen exprimiert wird (Betts et al. 2003).

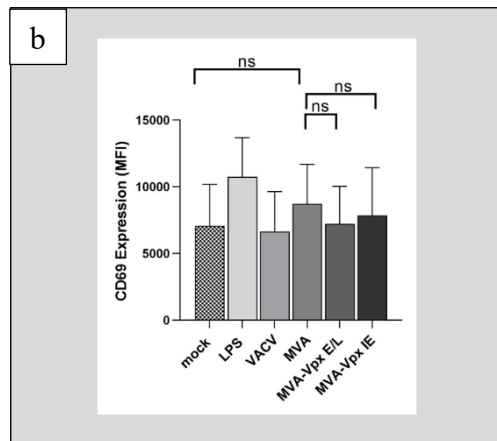
4-1BB (CD137) gehört zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (*Tumor necrosis factor receptor*-TNFR)-Familie und wird sehr schnell auf aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, aber auch auf aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, aber in geringerer Menge exprimiert. Sein Ligand 4-1BBL, gehört zur TNF-Familie und wird auf Antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, aktivierten B-Zellen oder Makrophagen exprimiert. Die 4-1LBB und 4-1LBBL Interaktion sorgt für die Stimulierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, wodurch diese expandieren und sowohl stark IL-2 und IFN- $\gamma$  sekretieren (Shuford et al. 1997).

Ähnlich wie bei dem T-Zell-Proliferationsassay wurden zunächst humane dendritische Zellen von den selben Spendern aus (4.2.6) infiziert und 16 h.p.i. wurden die vorher ebenfalls isolierten T-Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden die T-Zellen mit verschiedenen Antikörpern inkubiert und fluoreszenzzytometrisch gemessen (Abbildung 34 - 37).

## ERGEBNISSE

Der Vergleich in der CD69-Expression auf den T-Zellen, welche mit den dendritischen Zellen inkubiert wurden, die zuvor mit den einzelnen Pockenviren infiziert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch zur uninfizierten Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied erfasst werden (Abbildung 34 a, b).



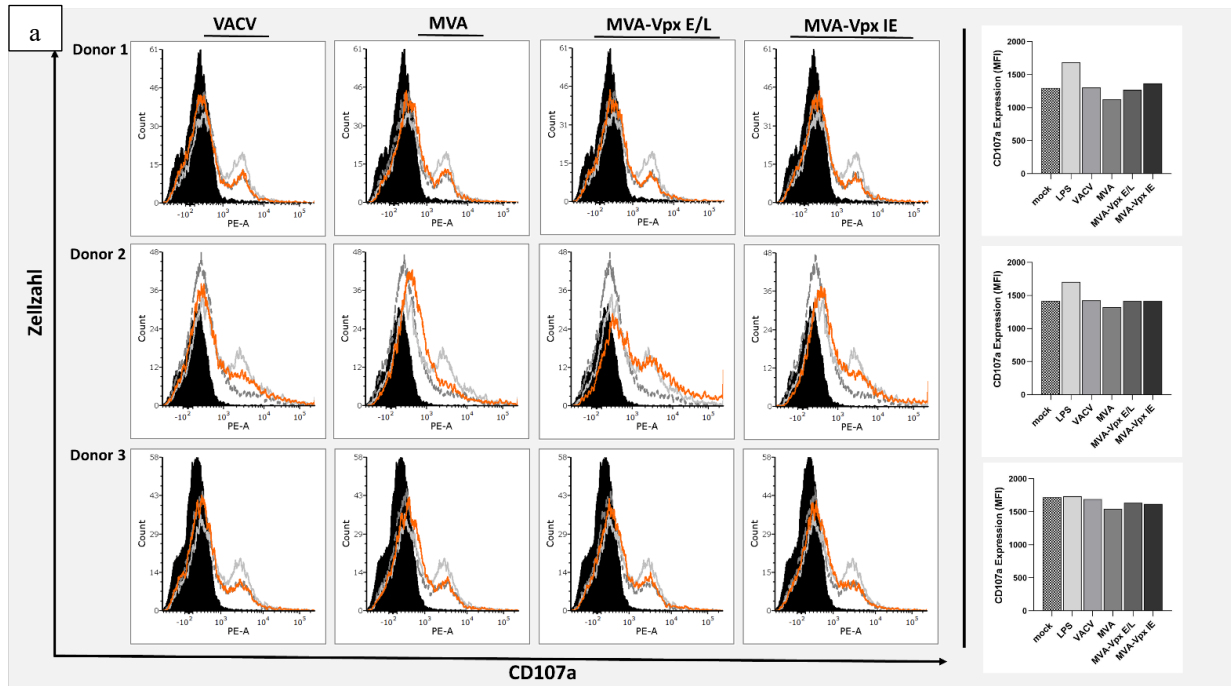


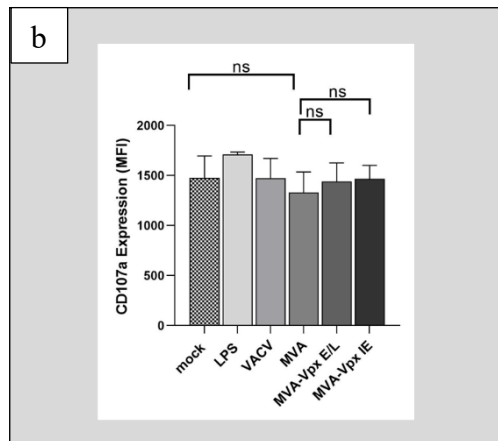
**Abbildung 34: CD69-Expression nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- a)** CD69-Expression auf T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation mit infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen Spendern. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninfizierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.  
Donor 1 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 10 Jahren erhalten; Donor 2 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 20 Jahren erhalten; Donor 3 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 30 Jahren erhalten.
- b)** Statistische Auswertung des in a) beschriebenen Experimentes Friedmans-Test auf Signifikanz mit einem p-Wert= 0.0022.



CD107a wird auf den T-Zellen, die mit den verschiedenen Pockenviren-infizierten humanen dendritischen Zellen inkubiert wurden, überall gleich stark exprimiert und zeigt keinen signifikanten Unterschied im Auslösen der Expression von CD107a durch die Inkubation mit den verschiedenen hier getesteten Pockenviren-infizierten humanen dendritischen Zellen (Abbildung 35 a, b).

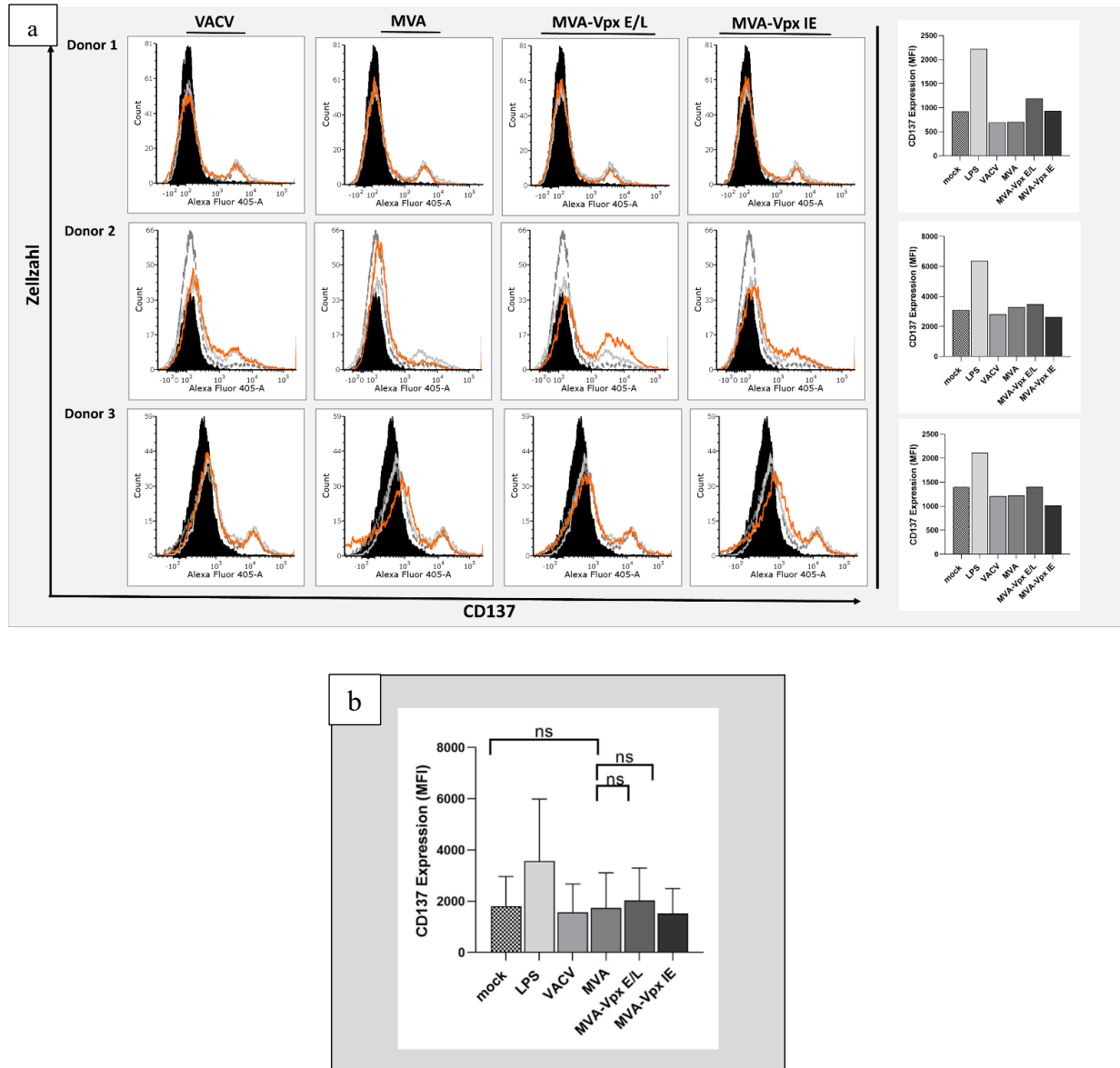




**Abbildung 35: CD107a-Expression nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

- a) CD107a-Expression auf T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation mit infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen Spendern Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninfizierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.
- b) Statistische Auswertung des in a) beschriebenen Experimentes Friedmans-Test auf Signifikanz mit einem p-Wert= 0.0084

Es konnte kein Unterschied in der CD137-Expression auf T-Zellen, welche vorher mit den verschiedenen in dieser Arbeit getesteten Pockenviren-infizierten humanen dendritischen Zellen inkubiert wurden, festgestellt werden (Abbildung 36 a, b).



**Abbildung 36: CD137-Expression nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

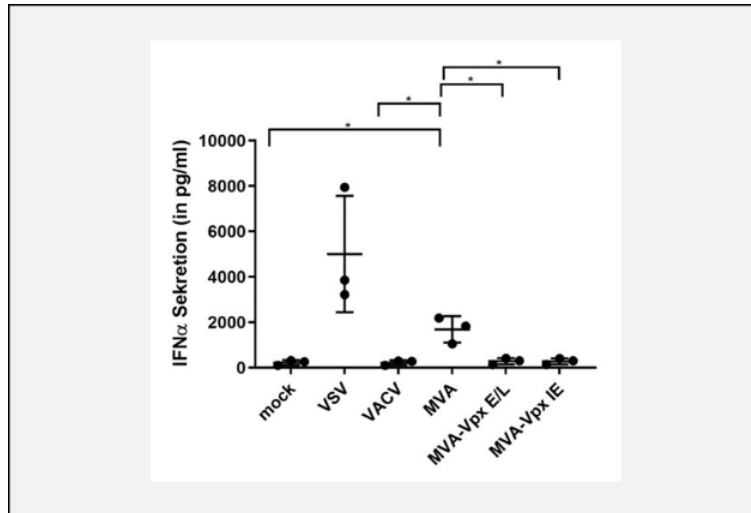
- a)** CD137-Expression auf T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation mit infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen Spendern. Schwarz eingefärbt = unbehandelte Kontrolle, hellgrauer Graph = Positivkontrolle (LPS-Kontrolle), grau gestrichelter Graph = uninfectierte (*mock*)-Kontrolle, oranger Graph = infizierte (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) Probe.  
Donor 1 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 10 Jahren erhalten; Donor 2 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 20 Jahren erhalten; Donor 3 = Pockenvirus-Impfung vor ca. 30 Jahren erhalten.
- b)** Statistische Auswertung des in a) beschriebenen Experimentes Friedmans-Test mit einem p-Wert= 0.0052.

#### 4.2.8 Typ I Interferon-Sekretion nach MVA-Vpx-Infektion

Ein weiterer wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort ist die Sekretion der Typ I Interferone  $\alpha$  und  $\beta$ . Typ I Interferone werden nach einer Virusinfektion induziert, um die Virusvermehrung in allen Zellen einzuschränken. Sie werden von infizierten Zellen freigesetzt und binden sowohl auf infizierten Zellen, als auch auf nicht-infizierten Zellen an einen Interferonrezeptor, welcher anschließend eine Reihe von Signalen auslöst. MVA kann in Mäusen und in murinen dendritischen Zellen eine Interferon-Antwort auslösen (Waibler et al. 2009), während VACV mithilfe von Inhibitoren, die in MVA deletiert sind, die Interferon-Antwort hemmt (siehe 1.5.1.3).

Für die Messung der Interferone  $\alpha$  und  $\beta$  wurden dendritische Zellen aus Buffy Coats erzeugt und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 1 sowie zum Vergleich mit MVA und VACV infiziert. Nach 16 h wurde die Sekretion der Typ I Interferone mittels eines enzymgekoppelten ELISAs gemessen (Abbildung 37, Abbildung 38). VSV-M2 (hier abgekürzt als VSV) wurde als Kontrolle verwendet, da gezeigt werden konnte, dass diese VSV-Variante eine Mutation im Matrixprotein hat (M51R) und nach Infektion von dendritischen Zellen zu hohen Interferon  $\alpha$ -Konzentrationen führt (Waibler et al. 2007).

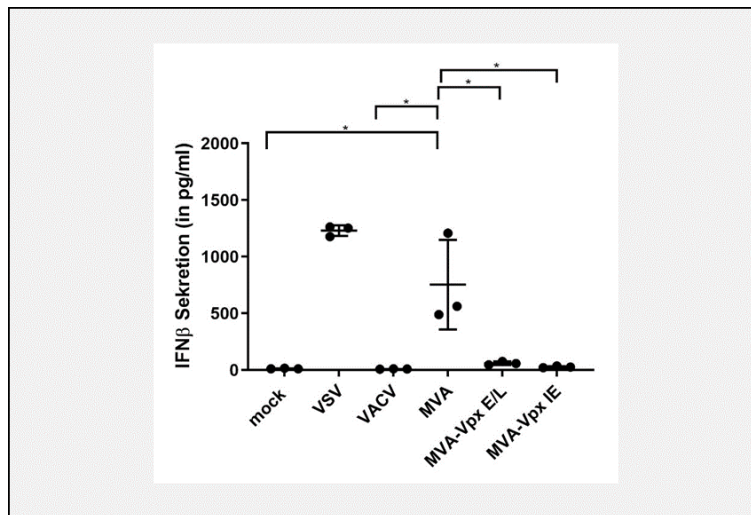
In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass humane dendritische Zellen, die mit dem MVA- infiziert worden sind, signifikant mehr Interferon- $\alpha$  sekretieren (Mittelwert bei ca. 1689 pg/ml), als humane dendritische Zellen, die mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren infiziert wurden. Die Sekretion von Interferon- $\alpha$  bei humanen dendritischen Zellen nach Infektion mit den rekombinanten MVA-Vpx Viren liegt bei den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit sehr früher Expression von Vpx (MVA-Vpx IE) im Mittel bei 281 pg/ml, während jene von MVA-Vpx E/L infizierten dendritischen Zellen im Mittel bei 285 pg/ml liegt. VACV-infizierte dendritische Zellen sekretieren mit 224 pg/ml weniger, als die beiden rekombinanten MVA-Vpx-Viren (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Interferon  $\alpha$ -Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

IFN  $\alpha$ -Sekretion wurde im Überstand nach Infektion (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) von humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen anonymen Spendern mittels enzymgekoppelten ELISA gemessen. Jeder Datenpunkt bedeutet ein Spender. Friedmans-Test mit einem p-Wert von 0.0018 \* bedeutet signifikanter Unterschied in der Interferon  $\alpha$ -Sekretion.

Die Sekretion von Interferon  $\beta$  ist nach Infektion im Allgemeinen weniger hoch als bei Interferon  $\alpha$  beobachtet. Sie liegt bei Interferon  $\beta$  bei maximal 1263 pg/ml (VSV), während sie bei Interferon  $\alpha$  7954 pg/ml betrug (Abbildung 37, Abbildung 38). Allerdings fällt auf, dass bei Infektion von humanen dendritischen Zellen mit MVA mehr Interferon  $\beta$  sekretiert wird, nämlich durchschnittlich 753 pg/ml als nach einer Infektion mit den rekombinanten MVA-Vpx-Virus MVA-Vpx E/L. Dort lag die Interferon  $\beta$ -Konzentration durchschnittlich lediglich bei ca. 60 pg/ml (MVA-Vpx E/L) während sie bei dem Virus mit der sehr frühen Vpx-Expression (MVA-Vpx IE) durchschnittlich bei 27 pg/ml liegt. Die Interferon  $\beta$ -Sekretion nach einer VACV-Infektion ist sehr reduziert mit einem Durchschnittswert von 8,8 pg/ml (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Interferon  $\beta$ -Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen**

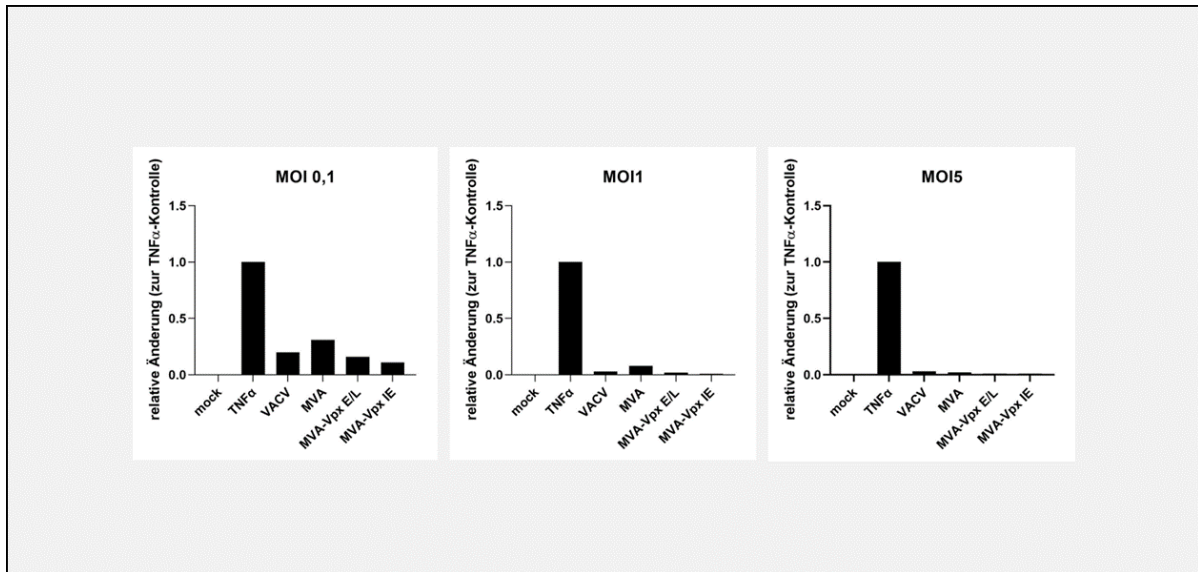
IFN  $\beta$ -Sekretion wurde im Überstand nach Infektion (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) von humanen dendritischen Zellen (16 h.p.i.; MOI 1) von 3 verschiedenen anonymen Spendern mittels enzymgekoppelten ELISA gemessen. Jeder Datenpunkt bedeutet ein Spender. Friedmans-Test mit einem p-Wert von 0.0001 \* bedeutet signifikanter Unterschied in der Interferon  $\beta$ -Sekretion.

#### **4.2.9 Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors nach MVA-Vpx-Infektion**

Die Veränderung der Wirts-Genexpression nach einer viralen Infektion dient vor allem dazu, dass eindringende Viren nicht mehr replizieren können. Eine der Hauptveränderungen in der zellulären Antwort ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B ist eigentlich inaktiv durch die Bindung an Inhibitoren der I $\kappa$ B-Familie. Werden die I $\kappa$ B-Proteine phosphoryliert und dem Abbau zugeführt, kann NF- $\kappa$ B in den Zellkern diffundieren und dort die Expression von Genen, die wichtig für die Immunantwort sowie Apoptose und Zellproliferation sind, anschalten. (Hoffmann und Baltimore 2006, Perkins und Gilmore, 2006). Viren (wie das VACV) haben Mechanismen entwickelt, um die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs zu unterdrücken, während MVA den NF- $\kappa$ B-Signalweg in HEK293-Zellen anschaltet (Oie und Pickup 2001). In einer Studie von 2018 konnte gezeigt werden, dass Vpx den NF- $\kappa$ B Signalweg inhibiert (Landsberg et al. 2018).

Es stellte sich daher die Frage, wie sich die Kombination von MVA mit Vpx auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auswirkt. Dafür wurde ein NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reporterassay mit HEK293-Zellen verwendet, welche stabil ein Luziferase-Reportergen unter Kontrolle eines Promotors mit NF- $\kappa$ B-Response Elementen, exprimieren. Vor dem Luziferasegen befindet sich ein sich 4mal wiederholendes Bindemotiv von NF- $\kappa$ B. Wird NF- $\kappa$ B aktiviert, bindet es dort an das Bindemotiv, wodurch die Expression der Luziferase ausgelöst wird. In diesem Assay wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zunächst durch eine 4-stündige Inkubation mit TNF $\alpha$  ausgelöst und anschließend mit den verschiedenen Pockenviren weitere 4 h infiziert, um zu schauen, ob die durch TNF $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung durch einen der Pockenviren (VACV, MVA, MVA-Vpx) gehemmt oder vielleicht sogar gesteigert wird (Abbildung 39).

Die TNF $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B scheint durch alle verwendeten Pockenviren herunterreguliert zu werden, wodurch weniger NF- $\kappa$ B an das NF- $\kappa$ B-responsive Element binden kann, das Luziferase-Reportergen weniger stark exprimiert wird und somit auch weniger Lichteinheiten gemessen werden (Abbildung 39). Es sieht so aus als würde MVA die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei einer MOI 0,1 und 1 im Vergleich zu VACV und den beiden MVA-Vpx-Viren am wenigstens herunterregulieren. Die beiden MVA-Vpx Viren scheinen die NF $\kappa$ B-Aktivierung bei den getesteten MOIs (0,1; 1; 5) stärker herunterzuregulieren als VACV (Abbildung 39).



**Abbildung 39: NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Pockenvirus-Infektion**

NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde nach 4 h TNF $\alpha$ -Inkubation und 4 h-Infektion (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) mit MOIs 0,1; 1; 5 gemessen. Dafür wurden HEK293(luc)-Zellen mit einem Luziferase-Gen, welches unter Kontrolle eines Promotors mit NF- $\kappa$ B-Response Elementen exprimiert wird, zuerst mit TNF $\alpha$  inkubiert, um den NF- $\kappa$ B-Signalweg anzuschalten und anschließend mit den verschiedenen Pockenviren infiziert. NF- $\kappa$ B-Aktivität wurde nach 16h Inkubation als relative Lichteinheiten (*relative light units*-RLU) detektiert.

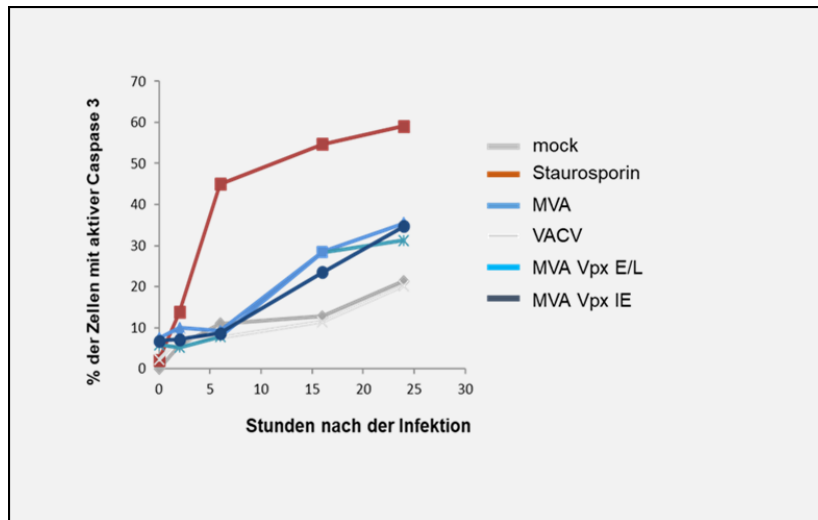


#### **4.2.10 Auslösen der Apoptose nach MVA-Vpx-Infektion**

Die Induktion der Apoptose durch dendritische Zellen dient bei einer Virusinfektion zur Beseitigung des Virus. Allerdings beeinflusst dies auch die Vektorimmunogenität. Um dem Apoptosemechanismus zu entkommen, haben Pockenviren wie VACV Mechanismen entwickelt, die den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindern (Volz und Sutter 2017). Die VACV-Mechanismen sind bei MVA weniger vorhanden, weshalb MVA-infizierte Zellen schneller in den Zelltod übergehen (Veyer et al. 2017). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass weder Vpx, noch HIV-2 in humanen Zellen Apoptose auslösen (Chang et al. 2000b).

Um herauszufinden wie sich die Verbindung MVA mit Vpx auf das Auslösen des programmierten Zelltods auswirkt, wurden humane dendritische Zellen wie oben beschrieben aus Buffy Coats hergestellt (4.2.2) und mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren mit einer MOI 3 sowie zum Vergleich mit MVA und VACV infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen permeabilisiert und die Aktivierung von Caspase-3, einen Marker für den Eintritt in den Zelltod, fluoreszenzzytometrisch gemessen (Abbildung 40).

Nach 6 h wird bei allen mit Vakziniaviren-infizierten Zellen nur bei 10 % der Zellen die Apoptose ausgelöst (Abbildung 40). Nach 16 h ist die Apoptoserate bei MVA und den rekombinanten MVA-Vpx-Viren schon bei ca. 30 %, während sie bei VACV nur bei ca 15 % liegt. Bei einer Infektion mit dem VACV wird erst nach 24 h bei ca. 20 % Zellen der Zelltod ausgelöst. Bei den humanen dendritischen Zellen, welche vorher mit dem rekombinanten Virus MVA-Vpx IE infiziert wurden, wird nach 24 h bei 30 % der Zellen die Apoptose ausgelöst. Bei einer Infektion mit MVA-Vpx E/L oder einer MVA-Infektion wird nach 24h bereits bei mehr als 30% die Apoptose ausgelöst (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Pockenvirus ausgelöste Apoptose in dendritischen Zellen**

Caspase-3-Aktivierung in infizierten (VACV, MVA, MVA-Vpx E/L, MVA-Vpx IE) humanen dendritischen Zellen (MOI 3) nach intrazellulärer Färbung fluoreszenzzytometrisch analysiert.

## 5 DISKUSSION

---

Das Ebolavirus hat zwischen 2014 und 2020/21 immer wieder zu größeren Ausbrüchen geführt. Eine der größten Ausbrüche fand von 2014 bis 2016 statt und war insofern besonders, dass sich nicht nur Menschen auf einem Kontinent ansteckten, sondern auch auf anderen Kontinenten wie Europa und Amerika einzelne Infektionen registriert wurden. Das Ebolavirus ist besonders gefährlich, da es sehr ansteckend ist und eine sehr hohe Mortalitätsrate hat. 2014 infizierten sich mehr als 23000 Menschen mit dem Ebolavirus, von denen mehr als 11000 Menschen starben (Leshner-Trevino 2016). Es wurde lange an passenden Therapiemöglichkeiten, sowie Schutzimpfungen geforscht. Heute sind sowohl zwei Medikamente als auch zwei verschiedene Schutzimpfungen zugelassen. Bei den Medikamenten handelt es sich um den Antikörper-Cocktail Inmazeb™ (Regeneron) und den Antikörper Ebanga (Ridgeback). Zu den Ebolavirus-Schutzimpfungen gehören *Ervebo* (rVSVΔ-ZEBOV-GP) (Ollmann Saphire 2020), und die aus zwei Einzeldosen bestehende Impfung mit Zabdeno (Ad26) (European Medicine Agency 2020b) und Mvabea (MVA) (European Medicine Agency 2020a).

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse im Bereich der beiden Therapieoptionen Medikation und Impfvektoren zu gewinnen, um neue Möglichkeiten im Kampf gegen das Ebolavirus zu erschließen.

### 5.1 Identifizierung von Inhibitoren des Ebolavirus-Zelleintritts innerhalb einer Hämofiltrat-Peptidbibliothek

Eine Erforschung des Ebolavirus ist äußerst schwierig, da sie unter sehr hohen Sicherheitsstandards (BSL4-Bedingungen) erfolgen muss. Aufgrund dieser hohen und aufwendigen Sicherheitsstandards gibt es weltweit nur sehr wenige BSL4-Labore, was die Arbeit am Ebolavirus zusätzlich erschwert. Daher wurde nach Alternativen gesucht, um dennoch Einblicke in die Ebolavirus-Replikation zu erhalten und somit antivirale Medikamente entwickeln zu können. Besonders interessant ist die Erforschung des Zelleintritts, da dieser gerne als Ansatzpunkt für inhibierende Behandlungsmöglichkeiten verwendet wird. Um den Ebolavirus-Zelleintritt unter BSL2-Bedingungen erforschen zu können, werden sogenannte pseudotypisierte Ebolavirus-Vektorpartikel genutzt (Salata et al. 2019a). Ein Pseudotyp ist ein Virus oder viraler Vektor, bei dem das ursprüngliche Hüllprotein durch ein Hüllprotein des zu untersuchenden Virus (hier das Ebolavirus-Glykoprotein (EBOV-GP) ausgetauscht wird. Der Wirtszelltropismus wird dadurch verändert (Tiscornia et al. 2006).

In Vorarbeiten wurde der für diese Arbeit verwendete Neutralisationsassay zunächst zur Untersuchung der Hemmung des Ebolavirus-Zelleintritts mithilfe eines Neutralisationsassays basierend auf Ebolavirus-Glykoprotein-Vektorpartikeln entwickelt (Beck et al. 2016). Dabei wurden Vektorpartikel hergestellt, die das Ebolavirus-Glykoprotein tragen und für das Luziferase-Gen kodieren. Das Ebolavirus-Glykoprotein wurde aufgrund seiner Rolle für den Zelleintritt verwendet (Lee und Saphire 2009b). Mithilfe dieses Neutralisationsassays konnten bereits Suramin (Henß et al. 2016) und Noricumazole A (ein Kaliumkanalinhibitor) (Beck et al. 2016) als Hemmer des Ebolavirus-Zelleintritts identifiziert werden.

Für die Untersuchung von humanen Peptiden mit Ebolavirus-spezifischer Hemmungsaktivität wurde eine Peptidbibliothek verwendet, welche aus humanem Hämofiltrat hergestellt wurde. Das humane Hämofiltrat wird durch Ionenchromatographie-Aufreinigung eines Abfallprodukts der Dialyse hergestellt (Schulz-Knappe et al. 1997). Mithilfe von Screenings der durch diese besondere Aufreinigungsmethode erhaltenden Peptidfraktionen konnten bereits Viren-hemmende Peptide identifiziert werden. Das VIRUS-INHIBITORY PEPTIDE (VIRIP) wurde bei einem Screen mit humanem Hämofiltrat als Inhibitor des HIV-gp41 Fusionspeptids, welches für den HIV-Membranfusion zuständig ist, entdeckt (Münch et al. 2007). CYVIP, ein Derivat des Neutrophil-aktivierenden Peptid 2, konnte als CMV-hemmendes Peptid ebenfalls mithilfe von Screens der in humanem Hämofiltrat enthaltenen Peptide, entdeckt werden (Borst et al. 2013).

Das verwendete Hämofiltrat wurde in dieser Arbeit in verschiedene pH-Pools und weiter in verschiedene Peptidfraktionen aufgeteilt. Mithilfe der aufgereinigten Peptidfraktionen sollten in einem Neutralisationsassay den Ebolavirus-Zelleintritt hemmende Peptide identifiziert werden. Als Kontrolle wurden pseudotypisierte Vesikular Stomatitis-Virus-Glykoprotein (VSV-G) Vektorpartikel eingesetzt. VSV-G-Vektorpartikel sind bekannt dafür Zellen sehr leicht transduzieren zu können.

Es konnte in jedem pH-Pool (1-8), welche durch die Kationenchromatographie-Aufreinigung entstanden sind, mindestens eine hemmende Peptidfraktion identifiziert werden (Abbildung 19). Auffällig war, dass immer wieder die hemmende Wirkung sowohl auf den EBOV-GP-Vektorpartikeln als auch auf den Kontroll-VSV-G Vektorpartikeln zu sehen war. Dies spricht gegen eine Ebolavirus-spezifische Wirkung. Bei der Peptidfraktion 27 aus pH-Pool 5 und der Peptidfraktion 22 aus pH-Pool 6 (Abbildung 19) wird zwar sowohl der Zelleintritt der Ebolavirus-Vektorpartikel als auch der der VSV-Vektorpartikel gehemmt, allerdings scheint die Hemmung der Ebolavirus-Vektorpartikel deutlich stärker auszufallen. Es muss jedoch

beachtet werden, dass durch die physikalische Aufreinigungsmethode die Peptide oder Teile der Peptide immer jeweils auch in die benachbarten Peptidfraktionen gelangen. Die potentiell hemmende Wirkung ist daher auch in den benachbarten Peptidfraktionen zu erwarten. Da dies bei den oben erwähnten einzelnen hemmenden Fraktionen nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der beobachteten Hemmung um ein Artefakt handelt. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, dass sich in den Fraktionen 24 - 28 des 7. pH-Pools ein Peptid befindet, welches in den mittleren Fraktionen 25 - 27 in höchster Konzentration vorhanden ist und damit stark hemmend wirkt. In den äußeren Fraktionen 24 und 28 könnte die Konzentration des Peptids geringer sein oder es könnten nur noch Teile des Peptids vorhanden sein. Obwohl auch die Peptidfraktionen 24 – 28 des pH-Pools 8 (Abbildung 19) als *hit* identifiziert wurden, wurde mit den Fraktionen aus dem pH-Pool 7 weiter verfahren. Die *hit*-Fraktionen aus dem pH-Pool 7 sind 5 nebeneinanderliegende Peptidfraktionen, von denen drei sehr stark den Ebolavirus-Zelleintritt hemmen und die von den Randfraktionen 24 und 28 mit hemmender Funktion „eingeschlossen“ wird. Fraktion 24 und 28 hemmen nicht so stark wie die mittig liegenden Fraktion 25 - 27 aber dennoch liegt das hemmende Signal bei unter 50% (Abbildung 19). Bei den Peptidfraktionen aus dem pH-Pool 8 befinden sich die drei stark hemmende nebeneinanderliegende Peptidfraktionen (24 - 27) nicht zwischen zwei Randfraktionen (23, 28), die zwar stark hemmen, aber nicht so stark wie die „mittig“ liegenden stark hemmenden Peptidfraktionen. Vor allem bei Peptidfraktion 23 (Randfraktion) fällt auf, dass sie die EBOV-GP-VP-Transduktion nicht mehr hemmt. Laut unseres Kooperationspartners Pharis Biotec GmbH ist es wahrscheinlich, dass sich das hemmende Peptid bzw. die Peptidfraktionen mittig befinden und dass die Randfraktionen auch noch stärker hemmen müssten (Randfraktion 23 von pH Pool 8 hemmt nicht sehr stark), weshalb mit den 5 Peptidfraktionen aus dem 7. pH-Pool weiterverfahren wurde.

Mit den erhaltenen 37 Peptidfraktionen aus der zweiten Chromatografie-Aufreinigung der Fraktionen 24 - 28 aus dem pH-Pool 7 wurde ein weiterer Neutralisationsassay durchgeführt (Abbildung 20). Dabei konnten die Fraktionen 15 - 17 als potentiell hemmende Peptidfraktionen des Zelleintritts von Ebolaviren identifiziert werden. Allerdings war auch in diesen Fraktionen das Luziferase-Signal von VSV-G-VP stark herabgesetzt, weshalb als nächster Schritt die Zelltoxizität untersucht wurde. Hierfür wurde ein ATP-basierter Luziferase-Zelltoxizitätsassay durchgeführt (Abbildung 21). Die Fraktionen 15 - 18 setzten das Luziferase-Signal stark herab (Abbildung 21), weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen tot sind. Diese hemmenden Eigenschaften sind jedoch vermutlich nicht auf die Zelltoxizität der Peptidfraktionen zurückzuführen, da die Peptide vor der Zugabe des Substrates *ATPlite*

(PerkinElmer) nicht gewaschen werden und somit bereits außerhalb der Zelle mit der zugegebenen Luziferase reagieren und das Lichtsignal dadurch hemmen können. Um zu untersuchen, ob es sich bei den Peptiden um Luziferase-Hemmer handelt, wurden HEK293-Zellen, die stabil die Luziferase exprimieren, mit den potentiell hemmenden Peptidfraktionen inkubiert. Bei anschließender Messung des Luziferase-Signals konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Fraktionen 15 - 18 das Luziferase-Signal der Zellen hemmen (Abbildung 22). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der beobachteten Hemmung nicht um einen Ebolavirus-spezifischen bzw. Ebolavirus-GP- und VSV-G-VP spezifischen Effekt handelt, sondern um einen Luziferase-hemmenden Effekt. Es wurde daher entschieden das Projekt einzustellen.

Es sind auch bereits Substanzen bekannt, die die *firefly*-Luziferase hemmen. Eine Substanz ist z.B. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), ein polyphenolischer Bestandteil von Weintrauben, Erdnüssen und verschiedenen Beeren, welches die *firefly* Luziferase schon in kleinen Konzentrationen hemmen kann (Bakhtiarova et al. 2006), wodurch es oft zu falsch positiven Ergebnissen kommt. Da der in dieser Arbeit verwendete Neutralisationsassay auf Luziferase basiert (Weber et al. 2014) und somit anfällig für die hemmende Wirkung der oben genannten Substanzen ist, würde es sich anbieten den Neutralisationsassay basierend auf anderen Proteinen wie z.B. dem grün fluoreszierenden Protein (*Green Fluorescent Protein*-GFP) zu etablieren. Da es sich dabei nicht um ein Enzym handelt, sondern um ein Protein wäre es wahrscheinlicher, dass die Peptidfraktionen nicht mit diesem reagieren und es somit nicht zu falsch positiven Hits kommt. Allerdings ist hierbei zu erwähnen, dass das GFP-Signal nicht so stabil ist wie das Luziferase-Signal und weniger sensitiv.

## 5.2 Optimierung des Pockenvirus-basierten Impfvektors MVA

### 5.2.1 DNA-Replikation und späte Genexpression nach MVA-Vpx Infektion

Die Zulassung zweier Impfstoffkandidaten gegen die Ebolavirus-Infektion ist ein Meilenstein im Kampf gegen das Virus. Während es sich bei dem Impfstoff *Ervebo* um einen einzelnen Ebolavirusspezifischen Impfvektor handelt (rVSVΔZEBOV-GP), ist der andere Impfkandidat ein *prime boost* Impfstoff. Dabei wird der Ad26-basierte EBOV-Impfstoff (*Zabdeno*) zu Beginn (*prime*) gegeben, worauf anschließend der *boost* mit *Mvabea* erfolgt, einem MVA-basierten Impfstoff, der für mehrere Glykoproteine verschiedener Ebolaviren kodiert. Oftmals wird MVA heutzutage als ein *booster* Impfkandidat verwendet, da er einzeln verabreicht in klinischen Phasen oftmals nicht zu einer langanhaltenden Immunogenität führt.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Effizienz der Immunogenität durch MVA ist die Blockierung der DNA-Replikation und späten Genexpression von MVA in humanen dendritischen Zellen (Drillien et al. 2000; Kastenmuller et al. 2006; Chahroudi et al. 2006). Im kaskadenartigen MVA-Replikationszyklus werden zunächst die frühen Gene exprimiert, anschließend erfolgt die DNA-Replikation, und erst dann können die späten Gene exprimiert werden. Sobald die DNA-Replikation blockiert wird, können keine späten MVA Gene exprimiert werden. Da aber oftmals die Expression der immunogenen Antigene unter der Kontrolle von späten Promotoren erfolgt, muss auch die MVA-DNA-Replikation gewährleistet sein, damit die Expression der späten Gene (die in der Impfstoffentwicklung die Antigene sind) stattfinden kann. Erst nach erfolgreicher Expression der späten Gene bzw. Antigene können diese auf der Zelloberfläche der Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (APCs) den T-Zellen präsentiert werden und eine starke Immunantwort auslösen. Die Blockierung der DNA-Replikation könnte auf SAMHD1 zurückzuführen sein. SAMHD1 ist eine dNTP-Triphosphohydrolase, welche als anti-HIV-Wirtszellfaktor identifiziert wurde (Lahouassa et al. 2012). SAMHD1 hydrolysiert dNTPs, sodass diese nicht mehr für die virale DNA-Polymerase zur Verfügung stehen, wodurch die virale DNA-Replikation zum Erliegen kommt. SAMHD1 konnte auch als antiviraler Faktor für eine Infektion von DNA-Viren wie z.B. Vakziniaviren in humanen aus Monozyten hergestellten Makrophagen Zellen identifiziert werden (Hollenbaugh et al. 2013).

Mithilfe des SIV-Genes *vpx* sollte der Block der MVA-DNA-Replikation in humanen dendritischen Zellen aufgehoben und die späte Genexpression gewährleistet werden.

Vpx ist ein virales Protein von HIV-2 und den meisten SIVs und bekannt dafür, SAMHD1 dem proteosomalen Abbau zuzuführen (Laguette et al. 2011).

Es wurden in Vorarbeiten rekombinante MVA-Viren hergestellt, die das SIV-Gen *vpx* entweder unter einem frühen und späten Promotor (MVA-Vpx E/L) oder ausschließlich unter einem sehr frühen Promotor (MVA-Vpx IE) exprimierten (Sliva et al. 2019). In dieser Arbeit wurden die Viren ausführlich charakterisiert.

Humanen dendritische Zellen nach Infektion mit diesen rekombinanten MVA-Vpx Viren, zeigen eine geringere SAMHD1-Proteinmenge als MVA-infizierte oder VACV-infizierte dendritische Zellen (Abbildung 24). Dies spricht dafür, dass SAMHD1 von Vpx dem proteosomalen Abbau zugeführt wird, denn nur in den mit den beiden Vakziniaviren ohne Vpx (VACV, MVA) infizierten dendritischen Zellen war die Proteinmenge von SAMHD1-Proteinmenge nicht reduziert.

Die DNA-Replikation konnte in humanen dendritischen Zellen, welche mit den rekombinanten MVA-Vpx-Viren infiziert wurden, wiederhergestellt werden (Abbildung 25). Allerdings ist auch die DNA-Replikation in den mit VACV-infizierten dendritischen Zellen erhöht. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass Vakziniaviren andere immunregulierende Proteine als MVA haben, die die DNA-Replikation ermöglichen (Hollenbaugh et al. 2013).

Die späte Genexpression konnte mithilfe der rekombinanten MVA-Vpx-Viren wiederhergestellt werden (Abbildung 26). Auch hierbei ist zu erwähnen, dass die späte Genexpression in VACV-infizierten dendritischen Zellen vorhanden ist, da sie immunregulierende Faktoren haben, die mit der Wirtszellabwehr interagieren können.



### 5.2.2 Reifung humaner dendritischer Zellen nach MVA-Vpx Infektion

Für die Induktion einer Immunantwort müssen sich dendritische Zellen in einem reifen Zustand befinden. Reife dendritische Zellen haben die Möglichkeit naive T-Zellen zu aktivieren und die Proliferation von T-Zellen zu stimulieren. Reife dendritische Zellen exprimieren unter anderem die kostimulierenden Rezeptoren CD80 und CD86 sowie den Reifungsmarker CD83 und das MHC-Molekül II. Das erste Signal zur Aktivierung von T-Zellen ist die Bindung von MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen an den T-Zell-Rezeptor der T-Zellen. Hierdurch werden den T-Zellen Antigene präsentiert. Handelt es sich bei dem MHC-Molekül, welches das Peptid präsentiert, um ein MHC I-Molekül, wird vorwiegend eine CD8<sup>+</sup>-zytotoxische Immunantwort ausgelöst, während bei einem mittels MHC II-präsentierten Peptid eine CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort auslöst wird. Als kostimulierendes Signal wird eine Bindung der kostimulierenden Rezeptoren CD80 und CD86 der dendritischen Zellen an CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen benötigt. Die kostimulierenden Oberflächenrezeptoren und die MHC-Moleküle müssen demnach exprimiert werden, damit eine effiziente Immunantwort ausgelöst werden kann (Murphy et al. 2009).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine MVA-Infektion von humanen dendritischen Zellen zu einem moderaten Anstieg von CD80 und CD83 24 h.p.i. (Drillien et al. 2004) sowie MHC I (Pascutti et al. 2011) und einen deutlicheren Anstieg von CD86 und MHC II 24 h.p.i. (Pascutti et al. 2011) im Vergleich zu uninfizierten dendritischen Zellen führt (Drillien et al. 2004; Pascutti et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte keine moderate Erhöhung der CD80-Expression auf MVA-infizierten dendritischen beobachtet werden. Die CD80-Expression war auf MVA-infizierten dendritischen Zellen im Vergleich zur uninfizierten (*mock*) Kontrolle MOI 1 etwas geringer und der Unterschied wurde bei MOI 5 sogar größer (Abbildung 27 c). Die geringere CD80-Expression auf MVA-infizierten dendritischen Zellen bei einer MOI 5 deutet auf eine Herabregulierung der CD80-Expression hin. Allerdings war die Herabregulierung bei MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen bei einer MOI 1 stärker als bei MVA-infizierten dendritischen Zellen. Bei einer MOI 5 war die Herabregulierung von CD80-Molekülen auf MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen ähnlich hoch wie bei MVA-infizierten (Abbildung 27 c).

In der vorliegenden Arbeit war die MHC I-Expression auf MVA-infizierten dendritischen Zellen nicht wie bei Pascutti et al. moderat erhöht, sondern ähnlich hoch wie bei uninfizierten humanen dendritischen Zellen (Abbildung 31 c). Die MVA-Vpx-infizierten dendritischen

Zellen regulieren die MHC I-Expression nicht herunter und exprimieren scheinbar sogar ähnlich viele MHC I-Moleküle wie MVA-infizierte dendritische Zellen (Abbildung 31 c).

Vergleichbar mit den Daten von Pascutti et al. könnte in dieser Arbeit eine Hochregulierung der CD86 und MHC II-Expression nach MVA-Infektion bei einer MOI 1 angenommen werden. (Abbildung 28 c; Abbildung 32 c). Bei den MVA-Vpx infizierten dendritischen Zellen konnte keine Erhöhung der CD86-Expression im Vergleich zu den uninfizierten festgestellt werden und es scheint als würden MVA-Vpx-Viren weniger CD86 exprimieren als MVA-infizierte dendritische Zellen (Abbildung 28 c). Die MHC II-Expression scheint nach einer MVA-Vpx-Infektion ähnlich hoch zu sein wie nach einer MVA-Infektion und sogar moderat erhöht im Vergleich zu den uninfizierten humanen dendritischen Zellen (Abbildung 32 c).

Drillien et al. konnten bei einer Pockenvirus-Infektion (VACV) keinen Anstieg der Oberflächenmarker CD86, CD83, MHC I und II beobachten und die CD80-Expression war sogar 24 h.p.i. herunterreguliert (Drillien et al. 2000). Die Herabregulierung der CD80-Expression durch VACV konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. VACV scheint die CD80-Expression herabzuregulieren und sogar stärker als die beiden MVA-Vpx-Viren (Abbildung 27 c). Zusätzlich deutete sich aber auch eine Herabregulierung der MHC I Moleküle auf humanen dendritischen Zellen nach VACV-Infektion an (Abbildung 31 c). Dennoch ist bekannt, dass VACV zu einer T-Zell-Immunantwort führen kann (Engelmayer et al. 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass humane dendritische Zellen nach einer MVA-Vpx-Infektion reifen können, indem sie bei einer MOI 1 CD86 und MHC I auf einem ähnlich hohen Level wie uninfizierte dendritische exprimieren und die Expression der MHC II-Moleküle sogar leicht erhöhen. Eventuell könnte das Zusammenspiel aus Vpx und MVA-Proteine dazu führen, dass humane dendritische Zellen zwar reifen, allerdings scheint das zugefügte Vpx dennoch eine Veränderung in der Reifung der dendritischen Zellen durch die Expression von späten pockenviralen Genen hervorzurufen, indem der Reifungsmarker CD86 nicht hochreguliert und die CD80-Expression stärker herunterreguliert wird.

Es ist bekannt, dass Vpx nach Infektion von dendritischen Zellen, welche bereits vorher mit HIV-1 infiziert wurden, nicht zur Reifung von dendritischen Zellen und somit auch nicht zur Expression von CD83 und CD86 führt (Hertoghs et al. 2015).

Es scheint in der Analyse der Reifungsmarker auch darauf anzukommen, welche APC untersucht werden. Royle et al. testete verschiedene aus PBMCs isolierte APC und konnte zeigen, dass eine HIV-2-Infektion von plasmazytoiden dendritischen Zellen (*plasmacytoid*

*dendritic cells*-pDC) zu einer Erhöhung der CD86-Expression führt, während die CD80-Expression unverändert blieb. Zusätzlich zeigten myeloide dendritische Zellen (*myeloid dendritic cells*-mDC) keine Erhöhung in der CD80 und CD86-Expression nach einer HIV-2-Infektion, während die CD80 und CD86-Expression auf Monozyten erhöht war (Royle et al. 2014). Inwiefern dies durch das in HIV-2 exprimierte Vpx zu erklären ist, bleibt abzuklären.

Interessanterweise konnte von Drillien et al. gezeigt werden, dass HeLa-Zellen, welche mit MVA oder dem Vakziniavirus Copenhagen (VACV-Cop) infiziert und anschließend mit dendritischen Zellen inkubiert wurden, die Expression von CD86 hochregulieren (Drillien et al. 2004). Die Hochregulierung der kostimulierenden Faktoren von dendritischen Zellen nach einer MVA-Infektion scheint nicht auf die direkte Infektion zurückzuführen zu sein, sondern auf die Stimulation der dendritischen Zellen durch andere infizierte Zellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MVA-infizierte dendritische Zellen früh in Apoptose gehen und andere dendritische Zellen diese toten Zellen aufnehmen, prozessieren und über die MHC-Moleküle präsentieren, wodurch T-Zellen aktiviert und eine Immunantwort ausgelöst werden kann. Dabei wird von Kreuz-Präsentation gesprochen (Pascutti et al. 2011). Es sollte getestet werden, ob eine Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-Vpx und einer anschließenden Inkubation mit humanen dendritischen Zellen zu einer Hochregulierung der CD80 und auch CD86-Expression führen kann. Somit wäre durch die Kreuz-Präsentation weiterhin die Ausbildung eines Antigen-Präsentierenden Phänotyps möglich.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass ein lentiviraler Impfvektor, welcher zusammen mit Vpx und CD40L (einem Protein, welches auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, an CD40 auf dendritischen Zellen bindet und dadurch für die Reifung der dendritischen Zellen sorgt) mit dendritischen Zellen inkubiert wurde, eine sehr starke Reifung der Zellen durch eine erhöhte Transduktionsrate induzierte (Norton et al. 2015). Inwiefern dieser Effekt auf Vpx zurückzuführen ist oder ob Vpx nur die Wirkung von CD40L verstärkt, bleibt abzuklären.

Es ist zusätzlich noch zu erwähnen, dass die Werte bei einer MOI 5 oftmals schwankten und dadurch hohe Standardabweichungen zustande gekommen sind, obwohl die einzelnen Spender eine ähnliche Tendenz wie z.B. bei der MHC-I-Expression zeigten (Abbildung 31 b, c). Dadurch, dass dies bei einer höheren MOI beobachtet wurde, könnte es daran liegen, dass der Titer des Virus nicht richtig angegeben ist. Andererseits ist auch bekannt, dass eine MVA-Infektion mit einer MOI 5 von humanen dendritischen Zellen zum massiven Zelltod führt

(Pascutti et al. 2011) und die sterbenden Zellen die Oberflächenmarker unterschiedlich exprimieren.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  wurden in dieser Arbeit zusätzlich als weitere Marker für eine Reifung der humanen dendritischen Zellen getestet. Diese wurden in einer Studie nach MVA-Infektion von humanen dendritischen Zellen in höheren Mengen (ca. 400 – 600 pg/ml für TNF $\alpha$ ) sekretiert als nach einer VACV-Infektion (Guerra et al. 2007). Dies konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden (Abbildung 29, Abbildung 30). Allerdings wurden die Werte in der Studie von Guerra et al. bereits nach 6 h.p.i mit einer MOI 5 gemessen. Bei der Betrachtung der Werte nach 16 h.p.i. ist zu erkennen, dass nicht bei allen Spendern die TNF $\alpha$ -Menge erhöht ist (Abbildung 30). In dieser Arbeit wurde erst nach 16 h.p.i. gemessen, und es wurde mit einer MOI 1 infiziert. Generell scheint die TNF $\alpha$ -Sekretion sehr spenderabhängig zu sein, denn sowohl in dieser Arbeit als auch in jener von Guerra et al. ist zu sehen, dass die TNF $\alpha$ -Sekretion je nach Spender stark schwankt. In der Studie von Drillien et al. war TNF $\alpha$  bei einer MOI 1 nach 24h nicht detektierbar, und die IL-6 Konzentration lag bei 461 pg/ml. Erst mit steigender MOI (MOI 5; MOI 20) konnte auch die IL-6 und TNF $\alpha$  gesteigert werden. Die Werte lagen allerdings unter denen durch eine LPS-Inkubation hervorgerufen Mengen (Drillien et al. 2004). In der hier vorliegenden Arbeit konnte nach Infektion mit MVA-Vpx nach 16 h. p. i. IL-6 und TNF $\alpha$ -Mengen detektiert werden, welche aber nicht höher lagen als bei uninfizierten dendritischen Zellen. Allerdings lagen sie deutlich unter den Mengen nach einer LPS-Infektion (Abbildung 29, Abbildung 30). Während nach einer MVA-Infektion mit einer MOI 1 nur durchschnittlich 300 pg/ml IL-6 sekretiert wurden, wurden dennoch im Gegensatz zu Drillien et al. TNF $\alpha$ -Mengen bei einer MOI 1 detektiert, welche im Durchschnitt bei 160 pg/ml lagen.

Die beiden rekombinanten MVA-Vpx-Viren führen nicht zur Änderung in der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  im Vergleich zu MVA-infizierten humanen dendritischen Zellen, allerdings zeigen sie auch keinen hemmenden Effekt in der IL-6 oder TNF $\alpha$ -Sekretion (Abbildung 29, Abbildung 30). Obwohl Cheng und Ratner einen hemmenden Effekt von Vpx auf die transaktivierende Funktion von IRF5 zeigen konnten, scheint dieser in der vorliegenden Arbeit nicht vorzukommen. Vpx interagiert laut Cheng und Ratner dabei mit IRF5, wodurch seine transaktivierende Funktion gehemmt wird, indem die Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  verhindert wird (Cheng und Ratner 2014). Nach Bindung der TLR7/8- und TLR9-Liganden an ihre Rezeptoren wird IRF5 durch den Myeloid-Differentiation-Primärantwort-Protein (*myeloid differentiation primary response protein-MyD88*)-Signalweg aktiviert. Dabei

wird es gebunden an MyD88 durch Phosphorylierung aktiviert. IRF5 wandert in den Zellkern und aktiviert dort die Produktion von IL-6, IL12p40 und TNF $\alpha$ . Durch einen noch unbekannten Mechanismus verhindert die Bindung von Vpx an IRF5 den transaktivierenden Vorgang.

### **5.2.3 MVA-Vpx-infizierte dendritische Zellen aktivieren T-Zellen *in vitro* nicht**

Bei der Entwicklung von Impfstoffvektoren ist nicht nur die Reifung der dendritischen Zellen von zentraler Wichtigkeit, sondern auch die Möglichkeit des Auslösens einer starken Immunantwort. Dabei ist es von großer Bedeutung, dass dendritische Zellen die T-Zellen zur Proliferation und zur Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen anregen können. Mithilfe dieser Gedächtnis-T-Zellen kann die Ausbreitung des Erregers nach einer erneuten Infektion mit demselben oder einem ähnlichen Erreger verhindert bzw. eingedämmt werden. Vakziniaviren können nach Infektion von dendritischen Zellen bei autologen PBLs, die bereits mit dem Pockenvirus in Kontakt gekommen sind und eine Gedächtnisantwort ausgebildet haben, eine starke Proliferation der T-Zellen auslösen (Drillien et al. 2000). Bei einer Impfung gegen Pockenviren und der daraus resultierenden Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mit Gedächtnis-T-Zellen kann eine starke Immunantwort bei erneuter Infektion erfolgen. Allerdings ist es auch möglich, dass nach einer Impfung keine starke Gedächtnis-Antwort entwickelt wird und somit die erneute Infektion mit demselben oder ähnlichen Erreger nicht zur gewünschten Immunantwort führt. Dies wurde auch von Drillien et al. beobachtet. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine MVA-Infektion von dendritischen Zellen von Spendern, die bereits gegen Pockenviren geimpft worden sind, nicht immer dazu führt, dass die autologen T-Zellen proliferieren (Drillien et al. 2000). Engelmayer et al. konnten bei einer Vakziniavirus-Infektion von naiven dendritischer Zellen beobachten, dass die T-Zell-Proliferation sogar unterdrückt wird (Engelmayer et al. 1999).

Um die T-Zell-Proliferation nach Impfung mit dem Pockenvirus zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit dendritische Zellen der geimpften Personen isoliert und mit den verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Pockenviren infiziert. Nur bei Donor 1 konnte eine starke Proliferation der T-Zellen nach einer VACV-Infektion beobachtet werden (Abbildung 33 a). Bei diesem Donor erfolgte die Pockenimpfung vor 10 Jahren, während die Impfung bei den anderen zwei Donoren mindestens 20 Jahre zurücklag. Der seit der Impfung vergangene Zeitraum, vor allem wenn keine Auffrischung erfolgte, beeinflusst maßgeblich die Effektivität

der Reaktion der PBLs. Es ist jedoch auch wie von Drillien et al. angenommen möglich, dass die Gedächtnis-Antwort zwar vorhanden ist, aber nicht stark genug ausfällt.

Interessanterweise werden laut Literatur T-Zellen von MVA-infizierten dendritischen Zellen nicht zur Proliferation angeregt. Allerdings konnten dabei MVA-infizierte HeLa-Zellen, welche erst mit dendritischen Zellen und anschließend mit T-Zellen inkubiert wurden, eine starke T-Zell-Proliferation induzieren (Drillien et al. 2004). Dies ist auf die sogenannte Kreuz-Präsentation zurückzuführen. Dabei nehmen dendritische Zellen Teile von anderen infizierten Zellen auf und präsentieren diese. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte keine Proliferation von T-Zellen, welche mit MVA-infizierten autologen humanen dendritischen Zellen inkubiert wurden, erkannt werden (Abbildung 33). Die Verwendung eines weiteren durch MVA-infizierten Zelltyps und die daraus resultierende Kreuzpräsentation durch hinzugegebene humane dendritische Zellen hätte demnach in dieser Arbeit zu einer Erhöhung der T-Zell-Proliferation führen können.

In dieser Arbeit konnte *in vitro* an MVA-infizierte dendritischen Zellen keine T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden. Auch bei MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen war dies nicht der Fall. Durch das zusätzliche Vpx in MVA kam es zwar zur DNA-Replikation (Abbildung 25) und späten Genexpression (Abbildung 26). Allerdings konnte eine Erhöhung der T-Zell-Immunantwort bzw. -Proliferation nicht nachgewiesen werden (Abbildung 33 a, b, c, d).

Nachdem keine T-Zell-Proliferation durch MVA-Vpx-infizierte humane dendritische Zellen festgestellt werden konnte, wurde getestet, wie stark die T-Zellaktivierungsmarker wie CD69, CD107a oder CD137 auf T-Zellen exprimiert wurden, die mit verschiedenen Pockenviren-infizierten dendritischen Zellen inkubiert worden sind. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der T-Zellaktivierungsmarker zur uninfizierten (*mock*) Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 34 - 37). Es ist bekannt, dass MVA T-Zellen aktivieren kann (Kastenmüller et al. 2006). Diese Aktivierung kommt aber wahrscheinlich nicht direkt durch die infizierten dendritischen Zellen, sondern durch die oben erwähnte Kreuz-Präsentation. Es wäre zu erwarten gewesen, dass eine MVA-Vpx-Infektion von dendritischen Zellen zu einer Erhöhung der T-Zellaktivierung führt, da zum einen die MVA-DNA-Replikation und späte MVA-Genexpression wiederhergestellt werden konnte und dadurch die späten Proteine durch die MHC I-Moleküle präsentiert und die T-Zellen damit aktiviert werden können. Zum anderen wurde bereits veröffentlicht, dass HIV-2-Infektion zu einer erhöhten T-Zellaktivierung führen (Whittle et al. 1998). Inwiefern dies am HIV-2 exprimierten Vpx liegt, bleibt abzuklären. Für

die Untersuchung der T-Zellimmunantwort sollten weitere T-Zellaktivierungsmarker untersucht werden. Zusätzlich könnte die IFN $\gamma$ -Produktion von T-Zellen untersucht werden, da IFN $\gamma$  eine wichtige Rolle in der Wirts-Immunabwehr zukommt und bei viralen Infektionen von aktivierten T-Zellen produziert wird (Henry und Norman 2003).

#### **5.2.4 Inhibierung der Typ I-Interferonsekretion durch MVA-Vpx**

Interferone sind wichtige Zytokine, die früh nach einer viralen Infektion unter anderem von dendritischen Zellen sekretiert werden und helfen, eine starke Immunantwort auszulösen. Ihre Expression wird strikt reguliert. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  gehören zu den Typ I Interferonen und werden produziert, nachdem die Viren durch Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*-PRRs) erkannt wurden. Dabei wird durch die PRRs ein bestimmtes molekulares Muster der Viren (*Pathogen Associated Molecular Pattern*-PAMP) erkannt, was zur Auslösung einer Signalkaskade führt. PRRs können unter anderem zyklische AMP/GMP-Synthasen (cGAS) oder DNA-Protein Kinasen sein. Die Signalkaskade induziert unter anderem die Translokation des Zellkern-Faktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern, die Aktivierung der Interferon-Regulatorfaktoren (Interferon regulatory factor - IRF). NF- $\kappa$ B ist ohne Signal durch die Bindung an I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert. Erst durch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch die I $\kappa$ B-Kinase IKK, dissoziiert I $\kappa$ B $\alpha$  von NF- $\kappa$ B. Die Freilassung von NF- $\kappa$ B aus dem I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplex ermöglicht die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. NF- $\kappa$ B, IRF3 und APC1 binden im Zellkern an den Interferon-Promotor und formen einen Komplex, welcher Enhanceosome genannt wird und unter anderem die Transkription von Interferon regulierten Genen (interferon regulated genes-ISG) initiiert bzw. verstärkt. IRF7 wird in einer ähnlichen Signalkaskade aktiviert und sorgt für die Transkription von IFN- $\alpha$ , kann aber auch die IFN- $\beta$ -Transkription aktivieren. Sobald die Interferone exprimiert worden sind, können sie nach Bindung an den Interferon  $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) im autokrinen Verlauf die eigene Zelle aktivieren, oder bei einer Nachbarzelle (parakrin) den JAK (Janus Kinase/STAT)-Signalweg (Aktivator der Transkription für Signalkaskade-*activator for transcription signalling cascades*) aktivieren (Briard et al. 2020).

Pockenviren haben einige Mechanismen entwickelt, um die Interferon-Sekretion und -Produktion zu unterdrücken. Das virale Protein B18 ist ein IFN I Bindeprotein, welches die Bindung von Typ I Interferonen an die Zellen inhibiert und somit die Aktivierung der Signalkaskade blockiert (Symons und Alcamì 1995). Das virale Protein E3 kann die OAS- und die PKR-Aktivierung inhibieren (Domingo-Gil et al. 2008). Die Proteine K1 und C7 sollen

ebenfalls mit noch unbekannten IFN-induzierten antiviralen Faktoren interagieren und dabei als Antagonist dienen (Meng et al. 2009). C6 konnte Typ I Interferon-Signalwege und Typ I Interferon-Produktion hemmen. Diese Hemmung scheint in einem späten Schritt des JAK/STAT-Signalweges stattzufinden (Stuart et al. 2016). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass Pockenvirus-Proteine wie B2R dafür sorgen, dass 2'-3' cGAMP abgebaut wird. 2'-3' cGAMP wird synthetisiert, wenn die cGAS die zytosolische Pockenvirus-DNA erkennt, wodurch die Interferon-Gene (STING) und somit auch die Interferon-Antworten aktiviert werden (Eaglesham et al. 2019). Das späte Pockenvirus-Genprodukt F17 konnte ebenfalls mit der Interferon-Signalkaskade in Verbindung gebracht werden. Dabei bindet F17 an Raptor und Rictor, Regulatoren von Säugetier-Ziel-der-Rapamycin Komplexen (*mammalian target of Rapamycin complexes*- mTOR). Durch diese Bindung wird die gegenseitige Beeinflussung von mTORC1 und mTORC2 unterbrochen, welches die Pockenvirus-Infektion koordiniert. Wenn Vakziniaviren wie *Western Reserve* (in dieser Arbeit VACV) die Zelle infizieren, kann das späte Genprodukt F17 dafür sorgen, dass mTOR fehlreguliert und cGAS abgebaut wird, und damit die Induktion der Interferonstimulierte-Genexpression nicht stattfinden kann (Meade et al. 2018).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Interferon-Sekretion von humanen dendritischen Zellen bei Infektion mit VACV deutlich niedriger war als bei Infektion mit MVA (Abbildung 37, Abbildung 38).

Während B2R und B18, ein lösliches IFN I Bindeprotein, in MVA nicht mehr aktiv sind, können funktionelle E3 Proteine und C6 noch gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Infektion mit MVA $\Delta$ E3L eine verstärkte Interferon-Sekretion in dendritischen Zellen aus Knochenmark von Mäusen gemessen wurde (Dai et al. 2014). Bei einer MVA-Infektion ohne das späte Genprodukt F17 wird die virale DNA von cGAS erkannt und in cGAMP umgewandelt. Durch diese Umwandlung kommt es zur Aktivierung von STING und zur Induktion einer IFN-stimulierten Genexpression, was erklärt, dass humane dendritische Zellen trotz E3 dennoch in der Lage sind nach einer MVA-Infektion eine Interferonantwort auszuführen.

In der vorliegenden Arbeit führte die Expression des SIV-Gens *vpx* in MVA-Vpx zwar zur späten Genexpression in dendritischen Zellen, dennoch war die Interferon- $\alpha$ - und - $\beta$ -Produktion herunterreguliert. Es wäre denkbar, dass durch die zusätzliche Expression von Vpx bei den MVA-Vpx-Viren das späte Genprodukt F17, ähnlich wie bei VACV, exprimiert wird und die IFN-regulierte Genexpression dadurch gehemmt wird. Möglich wäre auch eine direkte



Inhibierung der Interferon-Antwort. Bei einer Studie von Royle et al. konnte gezeigt werden, dass HIV-2 direkt die IFN- $\alpha$ -Produktion nach Zugabe von CpG-A unterdrückt (Royle et al. 2014).

### **5.2.5 Inhibierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach MVA-Vpx-Infektion**

Das Pockenprotein A46 kann an Adaptor-Moleküle binden, die wie MyD88 ein Toll/IL-1R-Motiv haben. Diese Bindung kann mitogenaktivierenden Proteinkinasen (*mitogen activated protein kinases* - MAPKs), NF- $\kappa$ B und IRF3 und somit auch die IFN- $\beta$ -Induktion inhibieren (Smith et al. 2013). Ein weiteres Pockenvirus Protein, B14, bindet an IKK $\beta$ , wodurch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B nicht mehr stattfindet und I $\kappa$ B an NF- $\kappa$ B gebunden bleibt (Chen et al. 2008).

Nach Oie et al. kann MVA die NF- $\kappa$ B-Antwort in humanen dendritischen Zellen induzieren. Die NF- $\kappa$ B-Antwort fiel zwar nicht so hoch aus wie bei einer Induktion durch TNF $\alpha$ , jedoch höher als in einer uninfizierten Zelle (Oie und Pickup 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit MVA die durch TNF $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-Antwort stark herunterreguliert. Bei steigender MOI wird auch die Inhibierung stärker (Abbildung 39). VACV hat Mechanismen entwickelt, mit denen sie die NF- $\kappa$ B-Antwort inhibieren. Während das IFN $\beta$ -inhibierende Protein A46 im MVA-Genom noch vorhanden ist, wird von MVA zusätzlich das Protein 183 exprimiert, welches 95% Aminosäure-Ähnlichkeit zu B14 hat. Es konnte gezeigt werden, dass 183 keine inhibierende Funktion auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität hat (McCoy et al. 2010), während bei B14 die inhibierende Wirkung vorzufinden ist. Dies macht deutlich, dass in MVA durchaus noch Pockenvirus-Proteine vorhanden sind, die mit der Wirtszell-Immunantwort bzw. dem NF- $\kappa$ B-Signalweg interagieren. Gleichzeitig allerdings fehlen MVA einige Pockenvirus-Proteine, wie B14, die sonst ebenfalls in den Mechanismus eingreifen. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass eine Infektion mit MVA zwar die NF- $\kappa$ B-Aktivität herunterreguliert, allerdings nicht so stark wie eine VACV-Infektion.

Die Zugabe von Vpx hemmt ähnlich wie MVA die NF- $\kappa$ B-Aktivität (Abbildung 39). Die Hemmung kann damit erklärt werden, dass auch für Vpx schon eine inhibierende NF- $\kappa$ B-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Vpx bindet an die Untereinheit p65/RelA des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors und sorgt mit dieser Bindung dafür, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität gehemmt wird (Landsberg et al. 2018).

### **5.2.6 Apoptose wird durch die MVA-Vpx-Infektion ausgelöst**

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein wichtiger Wirtszell-Abwehrmechanismus als Antwort auf eine virale Infektion. Durch die Apoptose der Zelle können Viren ihre Replikation nicht vollenden und es kommt zu weniger infektiösen viralen Nachkommen. Zudem werden Nachbarzellen durch die Apoptose andere Zellen „alarmiert“. Der programmierte Zelltod wird vor allem durch Caspasen, sowie das mitochondriale Protein B-Zell Lymphoma (B-cell lymphoma Bcl-2) und Bcl-2-ähnliche Proteine ausgeführt. Caspase 3 und Caspase 7 sind sehr wichtige Caspasen, die strukturelle und regulatorische Proteine spalten, die wichtig sind für das Zellüberleben und die Aufrechterhaltung der zellulären Funktion. Caspase 3 ist die wichtigste Zelltodausführende Caspase und wird sowohl durch extrinsisch als auch intrinsische Signalwege aktiviert. Caspase 3 sowie Caspase 7 können durch die Cytochrom c-Entlassung aus dem Mitochondrien sowie Bak-Translokation und AIF-Entlassung für weitere apoptoseführende Ereignisse führen (Brentnall et al. 2013).

Um dem Prozess des programmierten Zelltodes entgegenzuwirken, haben Viren (wie Pockenviren) spezifische Mechanismen entwickelt. Das Pockenvirus-Protein F1 z.B. ist ein Protein mit Bcl-2-ähnlicher Struktur und bindet an das pro-apoptotische Protein Bak, wodurch dessen Aktivierung gehemmt wird (Postigo et al. 2006). Eine Deletion von F1 führt zu einem starken Auftreten von Apoptose. MVA löst in humanen dendritischen Zellen generell schneller Apoptose aus als VACV. Dies konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden (Abbildung 40). Dennoch ist MVA in der Lage, eine ausreichend starke CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort auszulösen. Dies ist damit zu erklären, dass MVA zwar in den infizierten dendritischen Zellen den Zelltod auslöst, allerdings können Nachbarzellen Zelltrümmer dieser infizierten Zellen phagozytieren und über das MHC I-Molekül präsentieren, wodurch eine CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort induziert wird. Die Nachbarzellen kreuz-präsentieren demnach die von MVA exprimierte Antigene, die sie durch Phagozytose aufgenommen haben (Liu et al. 2008; Pascutti et al. 2011).

Es zeigte sich kein Unterschied in der Apoptose-Aktivität zwischen MVA und den rekombinanten MVA-Vpx-Viren (Abbildung 40). Dies könnte damit zu erklären sein, dass Vpx weder bekannt dafür ist die Apoptose auszulösen, noch sie zu unterdrücken (Chang et al. 2000a). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Vpx in Nachbar-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Apoptose auslösen kann (Bouzar et al. 2004). Es müsste noch getestet werden, ob dies auch bei einer Infektion von MVA-Vpx der Fall ist.

Die hier vorliegende Arbeit hat zu den Erkenntnissen geführt, dass durch Insertion von Vpx in das MVA-Genom die DNA-Replikation und späte Genexpression in humanen dendritischen Zellen wiederhergestellt werden konnte. Vpx scheint die Hochregulierung der Reifungsmarker CD80 und CD86 von dendritischen Zellen zu beeinflussen. Eine Induktion der T-Zell-Proliferation konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Typ I-Interferonantwort durch MVA-Vpx gehemmt wurde. Es müssen weitere Tests mit mehreren Spendern erfolgen sowie *in vivo* Infektionen in humanisierten Mäusen, um zu analysieren, ob die späte Genexpression zu einer verbesserten Immunantwort *in vivo* führen kann.

## 6 AUSBLICK

---

Die Peptidbibliothek aus humanem Hämofiltrat ist eine Quelle, um potentielle hemmende antivirale Peptide zu identifizieren. Zusätzlich kann mit dem hier verwendeten EBOV-GP-Neutralisationsassay, welcher pseudotypisierte Ebolavirus-Vektorpartikel verwendet, analysiert werden, welche Peptidfraktionen den Zelleintritt des Ebolavirus hemmen. Die Peptidfraktionen, die nach der ersten Aufreinigung als potentiell Ebolavirus-hemmend identifiziert wurden, stellten sich nach weiterführender Analyse als Luziferase-hemmend heraus. Allerdings waren andere Peptidfraktionen, z.B. aus dem pH-Pool 8 auch interessant. Um mehr Erkenntnisse zur Hemmung des Ebolavirus-Zelleintritts zu gewinnen, wären weitere Aufreinigungsschritte mit diesen Peptidfraktionen sowie eine darauffolgende Analyse im EBOV-GP-Neutralisationsassay möglich.

Die Hemmung der Typ I Interferon-Antwort und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wirft weitere Fragen im Bezug auf eine Erhöhung der Immunogenität der Vektoren durch die Expression von Vpx auf. Da es sich in dieser Arbeit verwendeten Systeme lediglich um *in vitro* Systeme handelte, sollte mit einem *in vivo*-Mausmodell mit humanisierten Mäusen getestet werden, inwiefern *in vivo* diese Hemmung der Typ I Interferon-Antwort und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Induktion einer Immunantwort beiträgt. Auch wäre es möglich, weitere Gene, wie das F17L-Gen, aus MVA-Vpx zu entfernen und somit dem hemmenden Effekt auf die Interferon-Antwort zu beseitigen. Allerdings ist nicht auszuschliessen, dass das Einfügen fremder Gene (wie in dieser Arbeit) oder das Entfernen von vakziniaviralen Genen den Phänotyp des untersuchten Vektors verändern kann. Dies konnte in dieser Arbeit anhand der veränderten Interferonantwort und des NF- $\kappa$ B-Signalweges verdeutlicht werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben Ansätze für eine besseres Ebolavirus-spezifisches Inhibitor Screening. Allerdings sollte der hier getestete Neutralisationsassay verändert werden oder weitere Peptide getestet werden.

Zusätzlich sollte mit den oben beschriebenen weiterführenden Versuchen zur Vektoroptimierung die Erkenntnisse über MVA-Vpx erweitert werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

Abel, Tobias; Kreppel, Florian; Ogris, Manfred; Büning, Hildegard (2011): Wie Genvektoren mit dem richtigen Schlüssel ausgestattet werden. Die Zelloberfläche gezielt ansteuern. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 40 (3), S. 225–238. DOI: 10.1002/pauz.201100418.

Agarwal, Sumit; Nikolai, Bryan; Yamaguchi, Tomoyuki; Lech, Patrycja; Somia, Nikunj V. (2006): Construction and use of retroviral vectors encoding the toxic gene barnase. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (4), S. 555–563. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.03.025.

Agnandji, Selidji T.; Huttner, Angela; Zinser, Madeleine E.; Njuguna, Patricia; Dahlke, Christine; Fernandes, José F. et al. (2016): Phase 1 Trials of rVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe. In: *The New England journal of medicine* 374 (17), S. 1647–1660. DOI: 10.1056/NEJMoa1502924.

Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Anantpadma, Manu; Kouznetsova, Jennifer; Wang, Hang; Huang, Ruili; Kolokoltsov, Andrey; Guha, Rajarshi et al. (2016): Large-Scale Screening and Identification of Novel Ebola Virus and Marburg Virus Entry Inhibitors. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60 (8), S. 4471–4481. DOI: 10.1128/AAC.00543-16.

Antoine, G., et al. (1998): The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. In: *Virology* 244 (2), S. 365–396. DOI: 10.1006/viro.1998.9123.

Anywaine, Zacchaeus; Whitworth, Hilary; Kaleebu, Pontiano; Praygod, George; Shukarev, Georgi; Manno, Daniela et al. (2019): Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania. In: *The Journal of infectious diseases* 220 (1), S. 46–56. DOI: 10.1093/infdis/jiz070.

- Bablanian, R.; Baxt, B.; Sonnabend, J.A. and M. Esteban (1978): Studies on the mechanisms of vaccinia virus cytopathic effects. II. Early cell rounding is associated with virus polypeptide synthesis. In: *Journal of general virology* 39 (3), S. 403–413. DOI: 10.1099/0022-1317-39-3-403.
- Bakhtiarova, Adel; Taslimi, Paul; Elliman, Stephen J.; Kosinski, Penelope A.; Hubbard, Brian; Kavana, Michael; Kemp, Daniel M. (2006): Resveratrol inhibits firefly luciferase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 351 (2), S. 481–484. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.10.057.
- Bakir, Talal M. (2018): The role of SAMHD1 expression and its relation to HIV-2 (Vpx) gene production. In: *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 26 (6), S. 903–908. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.03.005.
- Banchereau, Jacques; Steinmann, Ralph M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252. DOI: 10.1038/32588.
- Baseler, Laura; Chertow, Daniel S.; Johnson, Karl M.; Feldmann, Heinz; Morens, David M. (2017): The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. In: *Annual review of pathology* 12, S. 387–418. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100506.
- Beck, Simon; Henß, Lisa; Weidner, Tatjana; Herrmann, Jennifer; Müller, Rolf; Chao, Yu-Kai et al. (2016): Identification of entry inhibitors of Ebola virus pseudotyped vectors from a myxobacterial compound library. In: *Antiviral research* 132, S. 85–91. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.05.017.
- Bekerman, Elena; Neveu, Gregory; Shulla, Ana; Brannan, Jennifer; Pu, Szu-Yuan; Wang, Stanley et al. (2017): Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (4), S. 1338–1352. DOI: 10.1172/JCI89857.
- Beloglazova, Natalia; Flick, Robert; Tchigvintsev, Anatoli; Brown, Greg; Popovic, Ana; Nocek, Boguslaw; Yakunin, Alexander F. (2013): Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (12), S. 8101–8110. DOI: 10.1074/jbc.M112.431148.

- Berger, André; Sommer, Andreas F. R.; Zwarg, Jenny; Hamdorf, Matthias; Welzel, Karin; Esly, Nicole et al. (2011): SAMHD1-deficient CD14<sup>+</sup> cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. In: *PLoS pathogens* 7 (12), e1002425. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002425.
- Betts, Michael R.; Brenchley, Jason M.; Price, David A.; Rosa, Stephen C. de; Douek, Daniel C.; Roederer, Mario; Koup, Richard A. (2003): Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. In: *Journal of immunological methods* 281 (1-2), S. 65–78. DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00265-5.
- Blanchard, T. J.; Alcamí, A.; Andrea, P.; Smith, G. L. (1998): Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. In: *The Journal of general virology* 79 (Pt 5), S. 1159–1167. DOI: 10.1099/0022-1317-79-5-1159.
- Borst, Eva Maria; Ständker, Ludger; Wagner, Karen; Schulz, Thomas F.; Forssmann, Wolf-Georg; Messerle, Martin (2013): A peptide inhibitor of cytomegalovirus infection from human hemofiltrate. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57 (10), S. 4751–4760. DOI: 10.1128/AAC.00854-13.
- Bouzar, Amel Baya; Villet, Stephanie; Morin, Thierry; Rea, Angela; Genestier, Laurent; Guiguen, François et al. (2004): Simian immunodeficiency virus Vpr/Vpx proteins kill bystander noninfected CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes by induction of apoptosis. In: *Virology* 326 (1), S. 47–56. DOI: 10.1016/j.virol.2004.05.016.
- Bowyer, Georgina; Rampling, Tommy; Powlson, Jonathan; Morter, Richard; Wright, Daniel; Hill, Adrian V. S.; Ewer, Katie J. (2018): Activation-induced Markers Detect Vaccine-Specific CD4<sup>+</sup> T Cell Responses Not Measured by Assays Conventionally Used in Clinical Trials. In: *Vaccines* 6 (3), S. 50. DOI: 10.3390/vaccines6030050.
- Brentnall, Matthew; Rodriguez-Menocal, Luis; Ladron De Guevara, Rebeka; Cepero, Enrique; Boise H. Lawrence (2013): Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. In: *BMC Cell Biology* (14). DOI: 10.1186/1471-2121-14-32.

- Briard, Benoit; Place, David E.; Kanneganti, Thirumala-Devi (2020): DNA Sensing in the Innate Immune Response. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 35 (2), S. 112–124. DOI: 10.1152/physiol.00022.2019.
- Broyles, Steven S. (2003): Vaccinia virus transcription. In: *The Journal of general virology* 84 (Pt 9), S. 2293–2303. DOI: 10.1099/vir.0.18942-0.
- Callaway, Ewen (2019): First vaccine against deadly ebolavirus wins approval. In: *Nature* (575), S. 425–426. DOI: 10.1038/d41586-019-03490-8.
- Chahroudi, Ann; Garber, David A.; Reeves, Patrick; Liu, Luzheng; Kalman, Daniel; Feinberg, Mark B. (2006): Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus. In: *Journal of virology* 80 (17), S. 8469–8481. DOI: 10.1128/JVI.02749-05.
- Chang, Jung-LI; Chen, Chih-Hsiung; Urlacher, Vicki; Lee, Tze-Fun (2000a): Differential Apoptosis Effects of Primate Lentiviral Vpr and Vpx in Mammalian Cells. In: *Journal of biomedical science* (7), S. 322–333.
- Chang, L. J.; Chen, C. H.; Urlacher, V.; Lee, T. Z. (2000b): Differential apoptosis effects of primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cells. In: *Journal of biomedical science* 7 (4), S. 322–333. DOI: 10.1007/BF02253252.
- Chen, Ron A.-J.; Ryzhakov, Grigory; Cooray, Samantha; Randow, Felix; Smit, Geoffrey L. (2008): Inhibition of IkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. In: *PLoS pathogens* 4 (2), e22. DOI: 10.1371/journal.ppat.0040022.g001.
- Cheng, Xiaogang; Ratner, Lee (2014): HIV-2 Vpx protein interacts with interferon regulatory factor 5 (IRF5) and inhibits its function. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (13), S. 9146–9157. DOI: 10.1074/jbc.M113.534321.
- Condit, Richard; Moussatche, Nissin; Traktman, Paula (2006): In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. Advances in Virus Research. In: *Advances in virus research* 66, S. 31–124. DOI: 10.1016/S0065-3527(06)66002-8.



- Coquel, Flavie; Neumayer, Christoph; Lin, Yea-Lih; Pasero, Philippe (2019): SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. In: *Current opinion in immunology* 56, S. 24–30. DOI: 10.1016/j.coi.2018.09.017.
- Côté, Marceline; Misasi, John; Ren, Tao; Bruchez, Anna; Lee, Kyungae; Filone, Claire Marie et al. (2011): Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. In: *Nature* 477 (7364), S. 344–348. DOI: 10.1038/nature10380.
- Cronin, James; Zhang, Xian-Yang; Reiser, Jakob (2005): Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. In: *Current Gene Therapy* 5 (4), S. 387–398. DOI: 10.2174/1566523054546224.
- Dai, Peihong; Wang, Weiyi; Cao, Hua; Avogadri, Francesca; Dai, Lianpan; Drexler, Ingo et al. (2014): Modified vaccinia virus Ankara triggers type I IFN production in murine conventional dendritic cells via a cGAS/STING-mediated cytosolic DNA-sensing pathway. In: *PLoS pathogens* 10 (4), e1003989. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003989.
- Delaloye, Julie; Roger, Thierry; Steiner-Tardivel, Quynh-Giao; Le Roy, Didier; Knaup Reymond, Marlies; Akira, Shizuo et al. (2009): Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. In: *PLoS pathogens* 5 (6), e1000480. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000480.
- Dhama, Kuldeep; Karthik, Kumaragurubaran; Khandia, Rekha; Chakraborty, Sandip; Munjal, Ashok; Latheef, Shyma K. et al. (2018): Advances in Designing and Developing Vaccines, Drugs, and Therapies to Counter Ebola Virus. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1803. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01803.
- Dolnik, O.; Kolesnikova, L.; Becker, S. (2008): Filoviruses: Interactions with the host cell. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (5), S. 756–776. DOI: 10.1007/s00018-007-7406-2.
- Domingo-Gil, Elena; Pérez-Jiménez, Eva; Ventoso, Iván; Nájera, José L.; Esteban, Mariano (2008): Expression of the E3L gene of vaccinia virus in transgenic mice decreases host resistance to vaccinia virus and Leishmania major infections. In: *Journal of virology* 82 (1), S. 254–267. DOI: 10.1128/JVI.01384-07.
- Drexler, Ingo; Heller, Karl; Wahren, Britta; Erfle, Volker; and Sutter, Gerd (1998): Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a

potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. In: *Journal of general virology* 79 (Pt 2), S. 347–352. DOI: 10.1099/0022-1317-79-2-347.

Drillien, R.; Spehner, D.; Bohbot, A.; Hanau, D. (2000): Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. In: *Virology* 268 (2), S. 471–481. DOI: 10.1006/viro.2000.0203.

Drillien, Robert; Spehner, Danièle; Hanau, Daniel (2004): Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. In: *The Journal of general virology* 85 (Pt 8), S. 2167–2175. DOI: 10.1099/vir.0.79998-0.

Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R.J; Nguyen, M.; Trono, D.; Naldini, L. (1998a): A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. In: *Journal of virology*.

Dull, Tom; Zufferey, Romain; Kelly, Michael; Mandel, R. J. (1998b): A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. In: *Journal of virology* 72 (11), S. 8463–8471. DOI: 10.1128/JVI.72.11.8463-8471.

Dyall, Julie; Nelson, Elizabeth A.; DeWald, Lisa Evans; Guha, Rajarshi; Hart, Brit J.; Zhou, Huanying et al. (2018): Identification of Combinations of Approved Drugs With Synergistic Activity Against Ebola Virus in Cell Cultures. In: *The Journal of infectious diseases* 218 (suppl\_5), S672-S678. DOI: 10.1093/infdis/jiy304.

Eaglesham, James B.; Pan, Youdong; Kupper, Thomas S.; Kranzusch, Philip J. (2019): Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS-STING signalling. In: *Nature* 566 (7743), S. 259–263. DOI: 10.1038/s41586-019-0928-6.

Engelmayer, Jose; Larsson, Marie; Subklewe, Marion; Chahrودي, Ann; Cox, William I.; Steinman, Ralph M.; Bhardwaj, Nina (1999): Vaccinia Virus Inhibits the Maturation of Human Dendritic Cells: A Novel Mechanism of Immune Evasion. In: *Journal of immunology* 163 (12), S. 6762–6768.

European Medecine Agency (2020a): Mvabea, INN-Ebola vaccine (MVA-BN-Filo [recombinant]).

European Medecine Agency (2020b): Zabdeno, INN-Ebola vaccine (Ad26.ZEBOV-GP [recombinant]).

Fleming, A. (1992): On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. In: *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 93 (653), S. 306–317. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023.

García-Arriaza, Juan; Esteban, Mariano (2014): Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 10 (8), S. 2235–2244. DOI: 10.4161/hv.28974.

Gatherer, Derek (2014): The 2014 Ebola virus disease outbreak in West Africa. In: *The Journal of general virology* 95 (Pt 8), S. 1619–1624. DOI: 10.1099/vir.0.067199-0.

Goldstone, David C.; Ennis-Adeniran, Valerie; Hedden, Joseph J.; Groom, Harriet C. T.; Rice, Gillian I.; Christodoulou, Evangelos et al. (2011): HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. In: *Nature* 480 (7377), S. 379–382. DOI: 10.1038/nature10623.

Goncalves, Adriana; Karayel, Evren; Rice, Gillian I.; Bennett, Keiryn L.; Crow, Yanick J.; Superti-Furga, Giulio; Bürckstümmer, Tilmann (2012): SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to aicardi-goutières syndrome-associated mutations. In: *Human mutation* 33 (7), S. 1116–1122. DOI: 10.1002/humu.22087.

Goujon, Caroline; Rivière, Lise; Jarrosson-Wuilleme, Loraine; Bernaud, Jeanine; Rigal, Dominique; Darlix, Jean-Luc; Cimorelli, Andrea (2007): SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. In: *Retrovirology* 4, S. 2. DOI: 10.1186/1742-4690-4-2.

Guerra, Susana; Nájera, José Luis; González, José Manuel; López-Fernández, Luis A.; Climent, Nuria; Gatell, José M. et al. (2007): Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. In: *Journal of virology* 81 (16), S. 8707–8721. DOI: 10.1128/JVI.00444-07.

Harrison, S. C.; Alberts, B.; Ehrenfeld, E.; Enquist, L.; Fineberg, H.; McKnight, S. L. et al. (2004): Discovery of antivirals against smallpox. In: *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31), 11178–92. DOI: 10.1073/pnas.0403600101.

Henderson, Donald A. (2011): The eradication of smallpox--an overview of the past, present, and future. In: *Vaccine* 29 (Suppl 4), D7-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.080.

Henry, Helen L.; Norman, Anthony W. (Hg.) (2003): *Encyclopedia of Hormones. Interferon  $\gamma$* . Unter Mitarbeit von Howard A. Young und Deborah L. Hodge: Academic Press.

Henß, Lisa; Beck, Simon; Weidner, Tatjana; Biedenkopf, Nadine; Sliva, Katja; Weber, Christopher et al. (2016): Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry. In: *Virology journal* 13 (1), S. 149. DOI: 10.1186/s12985-016-0607-2.

Herrlich A., Mayr A. (1954): Vergleichende experimentelle Arbeiten über die Vaccine-Kuhpocken-Viren [Comparative experimental works on cow pox virus vaccines]. In: *Arch Hyg Bakteriol.* 7 (138), S. 479–504.

Hertoghs, Nina; van der Aar, Angelic M. G.; Setiawan, Laurentia C.; Kootstra, Neeltje A.; Gringhuis, Sonja I.; Geijtenbeek, Teunis B. H. (2015): SAMHD1 degradation enhances active suppression of dendritic cell maturation by HIV-1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (9), S. 4431–4437. DOI: 10.4049/jimmunol.1403016.

Hoenen, Thomas; Groseth, Allison; Feldmann, Heinz (2019): Therapeutic strategies to target the Ebola virus life cycle. In: *Nature reviews. Microbiology* 17 (10), S. 593–606. DOI: 10.1038/s41579-019-0233-2.

Hollenbaugh, Joseph A.; Gee, Peter; Baker, Jonathon; Daly, Michele B.; Amie, Sarah M.; Tate, Jessica et al. (2013): Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. In: *PLoS pathogens* 9 (6), e1003481. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003481.

Hood, Chantelle L.; Abraham, Jonathan; Boyington, Jeffrey C.; Leung, Kwanyee; Kwong, Peter D.; Nabel, Gary J. (2010): Biochemical and structural characterization of cathepsin L-processed Ebola virus glycoprotein: implications for viral entry and immunogenicity. In: *Journal of virology* 84 (6), S. 2972–2982. DOI: 10.1128/JVI.02151-09.

Johansen, Lisa M.; Brannan, Jennifer M.; Delos, Sue E.; Shoemaker, Charles J.; Stossel, Andrea; Lear, Calli et al. (2013): FDA-approved selective estrogen receptor modulators

inhibit Ebola virus infection. In: *Science translational medicine* 5 (190), 190ra79. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005471.

Kastenmuller, Wolfgang; Drexler, Ingo; Ludwig, Holger; Erfle, Volker; Peschel, Christian; Bernhard, Helga; Sutter, Gerd (2006): Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. In: *Virology* 350 (2), S. 276–288. DOI: 10.1016/j.virol.2006.02.039.

Kim, Baek; Nguyen, Laura A.; Daddacha, Waaqo; Hollenbaugh, Joseph A. (2012): Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (26), S. 21570–21574. DOI: 10.1074/jbc.C112.374843.

Kim, Narry V.; Mitrophanous, Kyriacos; Kingsman, Susan M.; KINGSMAN, Alan J. (1998): Minimal Requirement for a Lentivirus Vector Based on Human Immunodeficiency Virus Type 1. In: *Journal of virology* 72 (1), S. 811–816. DOI: 10.1128/JVI.72.1.811-816.1998.

Kuhn, Jens H.; Becker, Stephan; Ebihara, Hideki; Geisbert, Thomas W.; Johnson, Karl M.; Kawaoka, Yoshihiro et al. (2010): Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. In: *Archives of virology* 155 (12), S. 2083–2103. DOI: 10.1007/s00705-010-0814-x.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Laguette, Nadine; Sobhian, Bijan; Casartelli, Nicoletta; Ringiard, Mathieu; Chable-Bessia, Christine; Ségéral, Emmanuel et al. (2011): SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. In: *Nature* 474 (7353), S. 654–657. DOI: 10.1038/nature10117.

Lahouassa, Hichem; Daddacha, Waaqo; Hofmann, Henning; Ayinde, Diana; Logue, Eric C.; Dragin, Loïc et al. (2012): SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. In: *Nature immunology* 13 (3), S. 223–228. DOI: 10.1038/ni.2236.

- Landau, Nathaniel R.; Page, Kathleen A.; Littman, Dan R. (1991): Pseudotyping with Human T-Cell Leukemia Virus Type I Broadens the Human Immunodeficiency Virus Host Range. In: *Journal of virology* 65 (1), S. 162–169. DOI: 10.1128/JVI.65.1.162-169.1991.
- Landsberg, Christine D.; Megger, Dominik A.; Hotter, Dominik; Rückborn, Meike U.; Eilbrecht, Mareike; Rashidi-Alavijeh, Jassin et al. (2018): A Mass Spectrometry-Based Profiling of Interactomes of Viral DDB1- and Cullin Ubiquitin Ligase-Binding Proteins Reveals NF- $\kappa$ B Inhibitory Activity of the HIV-2-Encoded Vpx. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2978. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02978.
- Lee, Jeffrey E.; Fusco, Marnie L.; Hessel, Ann J.; Oswald, Wendelien B.; Burton, Dennis R.; Saphire, Erica Ollmann (2008): Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. In: *Nature* 454 (7201), S. 177–182. DOI: 10.1038/nature07082.
- Lee, Jeffrey E.; Saphire, Erica Ollmann (2009a): Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. In: *Future virology* 4 (6), S. 621–635. DOI: 10.2217/fvl.09.56.
- Lee, Jeffrey E.; Saphire, Erica Ollmann (2009b): Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. In: *Future virology* 4 (6), S. 621–635. DOI: 10.2217/fvl.09.56.
- Leroy, E. M.; Gonzalez, J-P; Baize, S. (2011): Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17 (7), S. 964–976. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03535.x.
- Leshner-Trevino, Ana Cristina (2016): Situation Report Ebola Virus Disease. In: *World Health Organisation*, S. 1–2.
- Liu, Hu; Tian, Ye; Lee, Kyungae; Krishnan, Pranav; Wang, May Kwang-Mei; Whelan, Sean et al. (2018): Identification of Potent Ebola Virus Entry Inhibitors with Suitable Properties for in Vivo Studies. In: *Journal of medicinal chemistry* 61 (14), S. 6293–6307. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00704.
- Liu, Luzheng; Chavan, Rahul; Feinberg, Mark B. (2008): Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key

role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. In: *BMC immunology* 9, S. 15. DOI: 10.1186/1471-2172-9-15.

Lomakina, G. Yu; Modestova, Yu A.; Ugarova, N. N. (2015): Bioluminescence assay for cell viability. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 80 (6), S. 701–713. DOI: 10.1134/S0006297915060061.

Mahnel H.; Mayr A. (1994): Erfahrungen bei der Schutzimpfung gegen Orthopocken von Mensch und Tier mit dem Impfstamm MVA [Experiences with immunization against orthopox viruses of humans and animals using vaccine strain MVA]. In: *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107 (8), S. 253–256.

Mallardo, Massimo; Leithe, Edward; Schleich, Sibylle; Roos, Norbert; Doglio, Laura; Krijnse Locker, Jacomine (2002): Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. In: *Journal of virology* 76 (10), S. 5167–5183. DOI: 10.1128/jvi.76.10.5167-5183.2002.

Markham, Anthony (2021): REGN-EB3: First Approval. In: *Drugs* 81 (1), S. 175–178. DOI: 10.1007/s40265-020-01452-3.

Martin, Baptiste; Hoenen, Thomas; Canard, Bruno; Decroly, Etienne (2016): Filovirus proteins for antiviral drug discovery: A structure/function analysis of surface glycoproteins and virus entry. In: *Antiviral research* (135), S. 1–14. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.09.001.

Mayr, A.; Hochstein-Mintzel, V.; Stickl, H. (1975): Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. In: *Infection* 3, S. 6–14. DOI: 10.1007/BF01641272.

Mayr A, Munz E. (1964): Veränderung von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen [Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures]. In: *Zentralbl Bakteriol Orig.* 195 (1), S. 24–35.

McCoy, Laura E.; Fahy, Aodhnait S.; Chen, Ron A-J; Smith, Geoffrey L. (2010): Mutations in modified virus Ankara protein 183 render it a non-functional counterpart of B14, an inhibitor of nuclear factor kappaB activation. In: *The Journal of general virology* 91 (Pt 9), S. 2216–2220. DOI: 10.1099/vir.0.022343-0.

- Meade, Nathan; Furey, Colleen; Li, Hua; Verma, Rita; Chai, Qingqing; Rollins, Madeline G. et al. (2018): Poxviruses Evade Cytosolic Sensing through Disruption of an mTORC1-mTORC2 Regulatory Circuit. In: *Cell* 174 (5), 1143-1157.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.053.
- Mehedi, Masfique; Falzarano, Darryl; Seebach, Jochen; Hu, Xiaojie; Carpenter, Michael S.; Schnittler, Hans-Joachim; Feldmann, Heinz (2011): A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. In: *Journal of virology* 85 (11), S. 5406–5414. DOI: 10.1128/JVI.02190-10.
- Meng, Xiangzhi; Jiang, Canhua; Arsenio, Janilyn; Dick, Kevin; Cao, Jingxin; Xiang, Yan (2009): Vaccinia virus K1L and C7L inhibit antiviral activities induced by type I interferons. In: *Journal of virology* 83 (20), S. 10627–10636. DOI: 10.1128/JVI.01260-09.
- Meyer, R. G.; Britten, C. M.; Siepmann, U.; Petzold, B.; Sagban, T. A.; Lehr, H. A. et al. (2005): A phase I vaccination study with tyrosinase in patients with stage II melanoma using recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA-hTyr). In: *Cancer Immunology* 54 (5), 453-467. DOI: 10.1007/s00262-004-0616-7.
- Misasi, John; Gilman, Morgan S. A.; Kanekiyo, Masaru; Gui, Miao; Cagigi, Alberto; Mulangu, Sabue et al. (2016): Structural and molecular basis for Ebola virus neutralization by protective human antibodies. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6279), S. 1343–1346. DOI: 10.1126/science.aad6117.
- Monath, Thomas P.; Fast, Patricia E.; Modjarrad, Kayvon; Clarke, David K.; Martin, Brian K.; Fusco, Joan et al. (2019): rVSVΔG-ZEBOV-GP (also designated V920) recombinant vesicular stomatitis virus pseudotyped with Ebola Zaire Glycoprotein: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. In: *Vaccine: X* 1, S. 100009. DOI: 10.1016/j.jvacx.2019.100009.
- Moss, B.; Shisler, J. L. (2001): Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. In: *Seminars in immunology* 13 (1), S. 59–66. DOI: 10.1006/smim.2000.0296.
- Mühlberger, Elke (2007): Filovirus replication and transcription. In: *Future virology* 2 (2), S. 205–215. DOI: 10.2217/17460794.2.2.205.
- Münch, Jan; Ständker, Ludger; Adermann, Knut; Schulz, Axel; Schindler, Michael; Chinnadurai, Raghavan et al. (2007): Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry



inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. In: *Cell* 129 (2), S. 263–275. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.042.

Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. (Hg.) (2009): *Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag*.

Natesan, Mohan; Jensen, Stig M.; Keasey, Sarah L.; Kamata, Teddy; Kuehne, Ana I.; Stonier, Spencer W. et al. (2016): Human Survivors of Disease Outbreaks Caused by Ebola or Marburg Virus Exhibit Cross-Reactive and Long-Lived Antibody Responses. In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 23 (8), S. 717–724. DOI: 10.1128/CVI.00107-16.

Nelson, Elizabeth A.; Dyal, Julie; Hoenen, Thomas; Barnes, Alyson B.; Zhou, Huanying; Liang, Janie Y. et al. (2017): The phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase inhibitor apilimod blocks filoviral entry and infection. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (4), e0005540. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005540.

Norton, T. D.; Miller, E. A.; Bhardwaj, N.; Landau, N. R. (2015): Vpx-containing dendritic cell vaccine induces CTLs and reactivates latent HIV-1 in vitro. In: *Gene therapy* 22 (3), S. 227–236. DOI: 10.1038/gt.2014.117.

Oie, K. L.; Pickup, D. J. (2001): Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-kappaB activation. In: *Virology* 288 (1), S. 175–187. DOI: 10.1006/viro.2001.1090.

Ollmann Saphire, Erica (2020): A Vaccine against Ebola Virus. In: *Cell* 181 (1), S. 6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.011.

Oudhoff, Menno J.; Bolscher, Jan G. M.; Nazmi, Kamran; Kalay, Hakan; van 't Hof, Wim; Amerongen, Arie V. Nieuw; Veerman, Enno C. I. (2008): Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (11), S. 3805–3812. DOI: 10.1096/fj.08-112003.

Page, Kathleen A.; Landau, Nathaniel R.; Littman, Dan R. (1990): Construction and Use of a Human Immunodeficiency Virus Vector for Analysis of Virus Infectivity. In: *Journal of virology* 64 (11), S. 5270–5276. DOI: 10.1128/JVI.64.11.5270-5276.1990.

- Pardi, Norbert; Hogan, Michael J.; Porter, Frederick W.; Weissman, Drew (2018): mRNA vaccines - a new era in vaccinology. In: *Nature reviews. Drug discovery* 17 (4), S. 261–279. DOI: 10.1038/nrd.2017.243.
- Pascutti, María F.; Rodríguez, Ana M.; Falivene, Juliana; Giavedoni, Luis; Drexler, Ingo; Gherardi, M. Magdalena (2011): Interplay between modified vaccinia virus Ankara and dendritic cells: phenotypic and functional maturation of bystander dendritic cells. In: *Journal of virology* 85 (11), S. 5532–5545. DOI: 10.1128/JVI.02267-10.
- Peterson, A. Townsend; Carroll, Darin S.; Mills, James N.; Johnson, Karl M. (2004): Potential mammalian filovirus reservoirs. In: *Emerging infectious diseases* 10 (12), S. 2073–2081. DOI: 10.3201/eid1012.040346.
- Picazo, Edwige; Giordanetto, Fabrizio (2015): Small molecule inhibitors of ebola virus infection. In: *Drug discovery today* 20 (2), S. 277–286. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.12.010.
- Postigo, A.; Cross, JR; Downward, J.; Way, M. (2006): Interaction of F1L with the BH3 domain of Bak is responsible for inhibiting vaccinia-induced apoptosis. In: *Nature* 13 (10), S. 1651–1662. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401853.
- Qiu, Xiangguo; Wong, Gary; Audet, Jonathan; Bello, Alexander; Fernando, Lisa; Alimonti, Judie B. et al. (2014a): Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. In: *Nature* 514 (7520), S. 47–53. DOI: 10.1038/nature13777.
- Qiu, Xiangguo; Wong, Gary; Audet, Jonathan; Bello, Alexander; Fernando, Lisa; Alimonti, Judie B. et al. (2014b): Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. In: *Nature* 514 (7520), S. 47–53. DOI: 10.1038/nature13777.
- Ramirez, J. C.; Gherardi, M. M.; Esteban, M. (2000): Biology of Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Recombinant Vector in Mice: Virus Fate and Activation of B- and T-Cell Immune Responses in Comparison with the Western Reserve Strain and Advantages as a Vaccine. In: *Journal of virology* 74 (2), S. 923–933. DOI: 10.1128/JVI.74.2.923-933.2000.
- Rimoin, Anne W.; Lu, Kai; Bramble, Matthew S.; Steffen, Imke; Doshi, Reena H.; Hoff, Nicole A. et al. (2018): Ebola Virus Neutralizing Antibodies Detectable in Survivors of

theYambuku, Zaire Outbreak 40 Years after Infection. In: *The Journal of infectious diseases* 217 (2), S. 223–231. DOI: 10.1093/infdis/jix584.

Roberts, Kim L.; Smith, Geoffrey L. (2008): Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. In: *Trends in microbiology* 16 (10), S. 472–479. DOI: 10.1016/j.tim.2008.07.009.

Rougeron, V.; Feldmann, H.; Grard, G.; Becker, S.; Leroy, E. M. (2015): Ebola and Marburg haemorrhagic fever. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 64, S. 111–119. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.01.014.

Royle, Caroline M.; Graham, David R.; Sharma, Simone; Fuchs, Dietmar; Boasso, Adriano (2014): HIV-1 and HIV-2 differentially mature plasmacytoid dendritic cells into IFN-producing cells or APCs. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (7), S. 3538–3548. DOI: 10.4049/jimmunol.1400860.

Ryoo, Jeongmin; Choi, Jongsu; Oh, Changhoon; Kim, Sungchul; Seo, Minji; Kim, Seok-Young et al. (2014): The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. In: *Nature medicine* 20 (8), S. 936–941. DOI: 10.1038/nm.3626.

Ryoo, Jeongmin; Hwang, Sung-Yeon; Choi, Jongsu; Oh, Changhoon; Ahn, Kwangseog (2016): SAMHD1, the Aicardi-Goutières syndrome gene and retroviral restriction factor, is a phosphorolytic ribonuclease rather than a hydrolytic ribonuclease. In: *Biochemical and biophysical research communications* 477 (4), S. 977–981. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.013.

Salata, Cristiano; Calistri, Arianna; Alvisi, Gualtiero; Celestino, Michele; Parolin, Cristina; Palù, Giorgio (2019a): Ebola Virus Entry: From Molecular Characterization to Drug Discovery. In: *Viruses* 11 (3). DOI: 10.3390/v11030274.

Salata, Cristiano; Calistri, Arianna; Alvisi, Gualtiero; Celestino, Michele; Parolin, Cristina; Palù, Giorgio (2019b): Ebola Virus Entry: From Molecular Characterization to Drug Discovery. In: *Viruses* 11 (3). DOI: 10.3390/v11030274.

Sancho, M. Carmen; Schleich, Sibylle; Griffiths, Gareth; Krijnse-Locker, Jacomine (2002): The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals

new insights into vaccinia virus morphogenesis. In: *Journal of virology* 76 (16), S. 8318–8334. DOI: 10.1128/jvi.76.16.8318-8334.2002.

Schittek, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S. et al. (2001): Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. In: *Nature immunology* 2 (12), S. 1133–1137. DOI: 10.1038/ni732.

Schulz-Knappe, Peter; Schrader, Michael; Ständker, Ludger; Richter, Rudolf; Hess, Rüdiger; Jürgens, Michael; Forssmann, Wolf-Georg (1997): Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. In: *Journal of Chromatography A* 776 (1), S. 125–132. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00152-0.

Seamon, Kyle J.; Sun, Zhiqiang; Shlyakhtenko, Luda S.; Lyubchenko, Yuri L.; Stivers, James T. (2015): SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity. In: *Nucleic acids research* 43 (13), S. 6486–6499. DOI: 10.1093/nar/gkv633.

Shuchman, Miriam (2015): Ebola vaccine trial in west Africa faces criticism. In: *The Lancet* 385 (9981), S. 1933–1934. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60938-2.

Shuford, Walter; Klussman, Kerry; Tritchler, Douglas; Loo, Deryk; Chalupny, Jan; Siadak, Anthony et al. (1997): 4-1BB Costimulatory Signals Preferentially Induce CD81 T Cell Proliferation and Lead to the Amplification In Vivo of Cytotoxic T Cell Responses 186 (1), S. 47–55. DOI: 10.1084/jem.186.1.47.

Siegrist, Claire-Anne (Hg.) (2008): Vaccines. Vaccine Immunology. Unter Mitarbeit von S. A. Plotkin, W. A. Orenstein und Offit P. A. China: Saunders.

Simmons, James A.; D'Souza, Ryan S.; Ruas, Margarida; Galione, Antony; Casanova, James E.; White, Judith M. (2016): Ebolavirus Glycoprotein Directs Fusion through NPC1+ Endolysosomes. In: *Journal of virology* 90 (1), S. 605–610. DOI: 10.1128/JVI.01828-15.

Sliva, Katja; Martin, Judith; Rhein, Christine von; Herrmann, Tobias; Weyrich, Anastasia; Toda, Masako; Schnierle, Barbara S. (2019): Interference with SAMHD1 Restores Late Gene Expression of Modified Vaccinia Virus Ankara in Human Dendritic Cells and Abrogates Type I Interferon Expression. In: *Journal of virology* 93 (22). DOI: 10.1128/JVI.01097-19.

- Smith, Geoffrey L.; Benfield, Camilla T. O.; Maluquer de Motes, Carlos; Mazzon, Michela; Ember, Stuart W. J.; Ferguson, Brian J.; Sumner, Rebecca P. (2013): Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. In: *The Journal of general virology* 94 (Pt 11), S. 2367–2392. DOI: 10.1099/vir.0.055921-0.
- Soneoka, Yuko; Cannon, Paula M.; Ramsdale, Emma E.; Griffiths, Joanne C.; Romano, Gaetano; Kingsman, Susan M.; KINGSMAN, Alan J. (1995): A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. In: *Nucl Acids Res* 23 (4), S. 628–633. DOI: 10.1093/nar/23.4.628.
- St Gelais, Corine; Li Wu (2011): SAMHD1: a new insight into HIV-1 restriction in myeloid cells. In: *Retrovirology* 8, S. 55. DOI: 10.1186/1742-4690-8-55.
- Stickl H.; Hochstein-Mintzel V. (1971): Die intrakutane Pockenimpfung mit einem schwach virulenten Vakzinia-Virus ("MVA-Virus" [Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus")]. In: *Munch Med Wochenschr* 113 (35), S. 1149–1153.
- Stuart, Jennifer H.; Sumner, Rebecca P.; Lu, Yongxu; Snowden, Joseph S.; Smith, Geoffrey L. (2016): Vaccinia Virus Protein C6 Inhibits Type I IFN Signalling in the Nucleus and Binds to the Transactivation Domain of STAT2. In: *PLoS pathogens* 12 (12), e1005955. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005955.
- Su, Jiaming; Rui, Yajuan; Lou, Meng; Yin, Lu; Xiong, Hanchu; Zhou, Zhenbang et al. (2019): HIV-2/SIV Vpx targets a novel functional domain of STING to selectively inhibit cGAS–STING-mediated NF-κB signalling. In: *Nat Microbiol* 4 (12), S. 2552–2564. DOI: 10.1038/s41564-019-0585-4.
- Sutter, Gerd; Moss, Bernard (1992): Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22), S. 10847–10851. DOI: 10.1073/pnas.89.22.10847.
- Symons, Julian A.; Alcamí, Antonio (1995): Vaccinia Virus Encodes a Soluble Type I Interferon Receptor of Novel Structure and Broad Species Specificity. In: *Cell* 81 (4), S. 551–560. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90076-4.
- Tiscornia, Gustavo; Singer, Oded; Verma, Inder M. (2006): Production and purification of lentiviral vectors. In: *Nature protocols* 1 (1), S. 241–245. DOI: 10.1038/nprot.2006.37.

- Tolonen, N.; Doglio, L.; Schleich, S.; Krijnse Locker, J. (2001): Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. In: *Molecular biology of the cell* 12 (7), S. 2031–2046. DOI: 10.1091/mbc.12.7.2031.
- Trad, M. A.; Naughton, W.; Yeung, A.; Mazlin, L.; O'sullivan, M.; Gilroy, N. et al. (2017): Ebola virus disease: An update on current prevention and management strategies. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 86, S. 5–13. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.11.005.
- Tran, Erin E. H.; Nelson, Elizabeth A.; Bonagiri, Pranay; Simmons, James A.; Shoemaker, Charles J.; Schmaljohn, Connie S. et al. (2016): Mapping of Ebolavirus Neutralization by Monoclonal Antibodies in the ZMapp Cocktail Using Cryo-Electron Tomography and Studies of Cellular Entry. In: *Journal of virology* 90 (17), S. 7618–7627. DOI: 10.1128/JVI.00406-16.
- Trapani, Joseph A.; Smyth, Mark J. (2002): Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (10), S. 735–747. DOI: 10.1038/nri911.
- Ura, Takehiro; Okuda, Kenji; Shimada, Masaru (2014): Developments in Viral Vector-Based Vaccines. In: *Vaccines* 2 (3), S. 624–641. DOI: 10.3390/vaccines2030624.
- van der Linden, Wouter A.; Schulze, Christopher J.; Herbert, Andrew S.; Krause, Tyler B.; Wirchnianski, Ariel A.; Dye, John M. et al. (2016): Cysteine Cathepsin Inhibitors as Anti-Ebola Agents. In: *ACS infectious diseases* 2 (3), S. 173–179. DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00130.
- Veyer, David L.; Carrara, Guia; Maluquer de Motes, Carlos; Smith, Geoffrey L. (2017): Vaccinia virus evasion of regulated cell death. In: *Immunology letters* 186, S. 68–80. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.03.015.
- Volz, A.; Sutter, G. (2017): Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. In: *Advances in virus research* 97, S. 187–243. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.07.001.
- Wahl-Jensen, Victoria M.; Afanasieva, Tatiana A.; Seebach, Jochen; Ströher, Ute; Feldmann, Heinz; Schnittler, Hans-Joachim (2005): Effects of Ebola virus glycoproteins

on endothelial cell activation and barrier function. In: *Journal of virology* 79 (16), S. 10442–10450. DOI: 10.1128/JVI.79.16.10442-10450.2005.

Waibler, Zoe; Anzaghe, Martina; Frenz, Theresa; Schwantes, Astrid; Pöhlmann, Christopher; Ludwig, Holger et al. (2009): Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. In: *Journal of virology* 83 (4), S. 1563–1571. DOI: 10.1128/JVI.01617-08.

Waibler, Zoe; Detje, Claudia N.; Bell, John C.; Kalinke, Ulrich (2007): Matrix protein mediated shutdown of host cell metabolism limits vesicular stomatitis virus-induced interferon-alpha responses to plasmacytoid dendritic cells. In: *Immunobiology* 212 (9-10), S. 887–894. DOI: 10.1016/j.imbio.2007.09.003.

Weber, Christopher; König, Renate; Niedrig, Matthias; Emmerich, Petra; Schnierle, Barbara S. (2014): A neutralization assay for chikungunya virus infections in a multiplex format. In: *Journal of virological methods* 201, S. 7–12. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.02.001.

White, Judith M.; Schornberg, Kathryn L. (2012): A new player in the puzzle of filovirus entry. In: *Nature reviews. Microbiology* 10 (5), S. 317–322. DOI: 10.1038/nrmicro2764.

Whittle, Hilton C.; Ariyoshi, Koya; Rowland-Jones, Sarah L. (1998): HIV-2 and T cell recognition. In: *Current opinion in immunology* (10), S. 382–387. DOI: 10.1016/S0952-7915(98)80108-8.

Wiedemann, Aurélie; Foucat, Emile; Hocini, Hakim; Lefebvre, Cécile; Hejblum, Boris P.; Durand, Mélanie et al. (2020): Long-lasting severe immune dysfunction in Ebola virus disease survivors. In: *Nature communications* 11 (1), S. 3730. DOI: 10.1038/s41467-020-17489-7.

Wool-Lewis, R. J.; Bates, P. (1998): Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. In: *Journal of virology* 72 (4), S. 3155–3160. DOI: 10.1128/JVI.72.4.3155-3160.1998.

Zhang, YunFang; Li, DaPeng; Jin, Xia; Huang, Zhong (2014): Fighting Ebola with ZMapp: spotlight on plant-made antibody. In: *Science China. Life sciences* 57 (10), S. 987–988. DOI: 10.1007/s11427-014-4746-7.

Zhao, Yuguang; Ren, Jingshan; Harlos, Karl; Jones, Daniel M.; Zeltina, Antra; Bowden, Thomas A. et al. (2016): Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein. In: *Nature* 535 (7610), S. 169–172. DOI: 10.1038/nature18615.

Zheng, Wei; Thorne, Natasha; McKew, John C. (2013): Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. In: *Drug discovery today* 18 (21-22), S. 1067–1073. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.07.001.

Ziegler, Steven; Ramsdell, Fred; Alderson, Mark (1994): The activation antigen CD69 12 (5), S. 456–465. DOI: 10.1002/stem.5530120502.



## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>Bicinchoninacid</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CD	Cluster of differentiation
CEF	Hühnerembryofibroblasten ( <i>Chickenembryofibroblast</i> )
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cGAS	Zyklische GMP-AMP-Synthase ( <i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i> )
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBOV	Ebolavirus
EBOV-GP	Ebolavirus Glykoprotein
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	75% (v/v) Ethanol in H <sub>2</sub> O bid.
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> )
FCS	Vorwärtsstreulicht ( <i>Forward scatter</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GMCSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HEK293luci	humane, embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney cells</i> ), welche stabil die Luziferase exprimieren
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
h.p.i.	Stunden nach der Infektion ( <i>hours post infection</i> )
HIV	Humanes Immundefizienz Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HF	Hämofiltrat
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN	Interferon
IMV	Intracellular Mature Virus
IRF	Interferon Regulator Faktor ( <i>Interferon regulatory factor</i> )
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mock	vortäuschen (hier: nicht infizierte Kontrolle)
MOI	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )

MVA	Modifiziertes Vakziniavirus Ankara ( <i>Modified Vaccinia virus Ankara</i> )
MVA-Vpx	Rekombinantes Modifiziertes Vakziniavirus Ankara mit Vpx-Koexpression
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NPC1	Niemann-Pick Krankheit des Typ C
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration des Wasserstoffs ( <i>potentia hydrogenii</i> )
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion ( <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
RLU	Relative Lichteinheiten ( <i>Relative Light Units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
rVSV	Recombinant vesicular stomatitis virus–Zaire Ebola virus
SAMHD1	Steriles alpha motiv und HD Domäne enthaltendes Protein 1 ( <i>sterile alpha motif and HD domain-containing protein 1</i> )
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SIV	Simianes Immundefizienz Virus ( <i>Simian immunodeficiency virus</i> )
STING	Stimulator von Interferongenen ( <i>stimulator of interferon genes</i> )
TBS	Tris gepufferte Salzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Vpx	Virales Protein X
VSV	Vesikulares Stomatitis Virus
VSV-G	Vesikulares Stomatitis Virus Glykoprotein
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen ( <i>weight per volume</i> )
YFP	Yellow fluorescent protein

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Geographische Verteilung der Ebolavirus Ausbrüche von 1976-2016 weltweit	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Filovirus-Partikels (A) und Ebolavirus-Genoms (B)	6
Abbildung 3: Ebolavirus-Lebenszyklus	8
Abbildung 4: Molekulare Oberfläche des Zaire-Ebolavirus-Glykoproteins	9
Abbildung 5: Darstellung der Untereinheiten des Ebolavirus Glykoproteins	10
Abbildung 6: Molekulare Oberfläche des Glykoprotein Trimers mit den verschiedenen Domänen	11
Abbildung 7: Freilegung der Rezeptorbindedomäne durch Cathepsin Spaltung	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ebolavirus-Zelleintritts	13
Abbildung 9: Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität	16
Abbildung 10: Lentivirales System der zweiten Generation	20
Abbildung 11: Lentivirales System der dritten Generation	20
Abbildung 12: Produktion von pseudotypisierten lentiviralen Vektoren	21
Abbildung 13: Ebolavirus-Zelleintrittsinhibitoren	26
Abbildung 14: Darstellung des MVA- und des Pockenvirus (VAR) -Genoms	35
Abbildung 15: Replikationszyklus von MVA in den meisten Säugerzellen	36
Abbildung 16: HIV-1 und HIV-2 Infektion von humanen myeloiden Zellen	41
Abbildung 17: Fließdiagramm der beiden hier verwendeten Optionen zur Ebolavirus-Therapie	43
Abbildung 18: Fließdiagramm der beiden hier verwendeten Optionen zur Ebolavirus-Therapie	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 19: Verfahren zur Generierung einer Peptidbibliothek aus humanem Hämofiltrat	70
Abbildung 20: Analyse des inhibierenden Effekts von Hämofiltrat-Peptiden (pH-Pool 1-8) auf EBOV-GP und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikeln	74
Abbildung 21: Analyse des inhibierenden Effekts von erneut aufgetrennten Hämofiltrat-Peptiden (pH-Pool 7) auf EBOV-GP und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikeln	75
Abbildung 22: Überprüfung der HF-Peptidfraktionen auf zelltoxische Eigenschaften	76
Abbildung 23: Peptidfraktionen hemmen die Luziferase-Enzymaktivität	77
Abbildung 24: Schematische Darstellung der kaskadenartigen MVA (oben) und möglichen MVA-Vpx-Replikation in humanen dendritischen Zellen (unten)	80
Abbildung 25: Verringerung der SAMHD1-Proteinmenge in Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	87
Abbildung 26: Erhöhung der DNA-Replikation in MVA-Vpx-infizierten dendritischen Zellen	89
Abbildung 27: Expression des späten Proteins B5R in Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	91
Abbildung 28: CD80-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	95
Abbildung 29: CD86-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	97
Abbildung 30: IL-6-Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	99
Abbildung 31: TNF $\alpha$ -Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	99
Abbildung 32: MHC I-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen	102

<b>Abbildung 33: MHC II-Expression auf Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>104</b>
<b>Abbildung 34: T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>110</b>
<b>Abbildung 35: CD69-Expression nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>113</b>
<b>Abbildung 36: CD107a-Expression nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>115</b>
<b>Abbildung 37: CD137-Expression nach Inkubation mit Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>116</b>
<b>Abbildung 38: Interferon <math>\alpha</math>-Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>118</b>
<b>Abbildung 39: Interferon <math>\beta</math>-Sekretion von Pockenvirus-infizierten dendritischen Zellen</b>	<b>119</b>
<b>Abbildung 40: NF-<math>\kappa</math>B-Aktivierung nach Pockenvirus-Infektion</b>	<b>121</b>
<b>Abbildung 41: Pockenvirus ausgelöste Apoptose in dendritischen Zellen</b>	<b>123</b>

## 10 PUBLIKATIONEN

---

Sliva, Katja; **Martin, Judith**; Von Rhein, Christine; Herrmann, Tobias; Weyrich, Anastasia; Toda, Masako; Schnierle, Barbara S. (2019): Interference with SAMHD1 Restores Late Gene Expression of Modified Vaccinia Virus Ankara in Human Dendritic Cells and Abrogates Type I Interferon Expression. In: *Journal of virology* 93 (22). DOI: 10.1128/JVI.01097-19.

Rhein von, Christine; Weidner, Tatjana; Henß, Lisa; **Martin, Judith**; Weber, Christopher; Sliva, Katja; Schnierle Barbara S. (2016): Curcumin and Boswellia serrata gum resin extract inhibit chikungunya and vesicular stomatitis virus infections in vitro. In: *Antiviral Research* 125. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.11.007.

## 11 KONFERENZEN

---

### Konferenzen mit eigenem Vortrag:

- 2016: „*Optimization of the vaccine vector MVA*“, Jährliches Forschungs-Retreat des Paul-Ehrlich Instituts, Ronneburg

### Konferenzen mit Postervorstellung:

- 2016: „*Identification of Ebolavirus cell entry inhibitors*“, 26. Jährliches Meeting der Society of Virology, Münster
- 2016: „*Identification of Ebolavirus cell entry inhibitors*“, Jährliches Forschungs-Retreat des Paul-Ehrlich-Instituts, Ronneburg

## 12 DANKSAGUNG

---

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Süß für die kurzfristige Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und das entgegenkommende Verständnis bedanken diese Arbeit noch zu Ende zu bringen.

Prof. Dr. Barbara Schnierle möchte ich dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gab diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe 2/2 (AIDS, neue und neuartige Erreger) am Paul-Ehrlich-Institut durchzuführen. Ich möchte ihr auch dafür danken, dass sie nach so langer Zeit die Arbeit weiterhin durchgelesen und mich trotz der Umstände immer unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Heike und Lisa, die mir mit Rat und Tat vor allem in der Schwangerschaft im Labor und Büro zur Seite standen.

Ein riesengroßes fettes Dankeschön geht an meine super schlaunen, super schönen und super treuen Mädels aus der NG3, die mich nach wie vor immer unterstützen und für mich da sind, sei es wissenschaftlich oder persönlich. Namentlich muss ich da definitiv meine liebe Inselbewohnerin Dr. Lea Patasic, das Arbeitstier Dr. Kerstin Schott und die liebe Dr. Alexandra Borch erwähnen. Maiwenn möchte ich danken, dass sie vor allem zu meinen aktiven PEI-Zeiten da war und mir bzw. uns ein Dach über den Kopf gegeben hat. Dafür werde ich ewig in deiner Schuld stehen.

Ich möchte auch meinen lieben Mädels *in crime* Dr. Verena Küppers und Stéphanie Häuselmann für das Korrekturlesen und das Gutzureden danken.

Einem großen Dank gebührt dem ehrenhaften Dr. Le Bleu Gast. Ich kann nicht in Worte fassen, was du uns bedeutest. Ohne dich wären wir nicht da, wo wir jetzt sind.

Meine Mama, mein Papa und mein Bruder Fabian möchte ich hier auch erwähnen, da sie wesentlich zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen haben und mich immer unterstützt haben, egal wie aussichtslos der Weg zu sein schien.

Der größte DANK geht an meinen Mann. Du hast mir so viel Kraft gegeben, mich inspiriert, mich immer motiviert und Emilia aus dem Arbeitszimmer geschleust, wenn ich gerade mal wieder mit rauchendem Kopf vor dieser Arbeit saß. Du hast wirklich immer an mich geglaubt, vor allem in Momenten, in denen ich es nicht konnte (und davon gab es sehr viele...). Ohne dich wäre das alles hier nicht möglich.

## 13 LEBENSLAUF

---

### **Persönliche Daten:**

Name	Judith Atgé Martin
Geburtstag	07.01.1988
Geburtsort	Berlin

### **Arbeitserfahrung:**

03/2019-jetzt	Biologin bei Auxenion Research AG, Allschwil
---------------	--

### **Akademische Ausbildung:**

07/2015-2018	Doktorarbeit am Paul-Ehrlich Institut unter der Betreuung von Prof. Dr. Barbara Schnierle und Prof. Dr. Beatrix Süß
--------------	---

09/2012-11/2014	Masterstudium an der Universität Hamburg mit Masterarbeit am Heinrich-Pette Institut in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dobner
-----------------	--

09/2010-07/2012	Bachelorstudium an der TU Dresden mit Bachelorarbeit bei Prof. Dr. Göttfert
-----------------	---

09/2009-07/2010	Bachelorstudium an der Eberhard-Karls Universität in Tübingen
-----------------	---

### **Schulische Ausbildung**

2005-2008	Abitur an der Romain-Rolland Oberschule, Berlin
2004-2005	Lycée Paul Broca, Ste Foy la Grande
2001-2004	Marie-Curie Gymnasium, Hohen Neuendorf



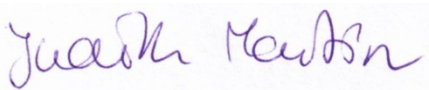
## 14 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

---

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 01.06.2021

A handwritten signature in purple ink, appearing to read "Jochen Meißner".